

Einfluss der 3'untranslatierten Region des IL-10 Gens auf die Genexpression

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Anne Wendel

geboren am 10. Dezember 1978 in Borna

Gutachter:

1. Prof. Dr. K.-J. Halbhuber, Jena
2. PD Dr. Dr. K. Friedrich, Jena
3. Prof. Dr. G. Aust, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19. Dezember 2006

Abkürzungsverzeichnis

<i>A</i>	Adenin
<i>Abb.</i>	Abbildung
<i>AmpR</i>	Ampicillin-Resistenzgen
<i>APC</i>	Antigen präsentierende Zellen
<i>ARE</i>	A + U reiche Elemente
<i>ATF</i>	aktivierender Transkriptionsfaktor
<i>cAMP</i>	zyklisches Adenosin-Monophosphat
<i>bp</i>	Basenpaar(e)
<i>C</i>	Cytosin
<i>CD</i>	<i>cluster of differentiation</i>
<i>C/EBP</i>	CCAAT/ <i>enhancer</i> bindendes Protein
<i>CIP</i>	<i>calf intestine phosphatase</i>
<i>CMV</i>	Zytomegalievirus
<i>CRE</i>	cAMP-respondierende Elemente
<i>CREB</i>	CRE-bindendes Protein
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>E</i>	Enhancer
<i>E. coli</i>	Escherischia coli
<i>ELISA</i>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>EMBL</i>	<i>European Molecular Biology Laboratory Heidelberg</i>
<i>G</i>	Guanin
<i>GM-CSF</i>	<i>granulocyte and macrophage colony stimulating factor</i>
<i>IBD</i>	chronisch entzündliche Darmerkrankung
<i>IFN</i>	Interferon
<i>IL</i>	Interleukin
<i>IU</i>	internationale Einheit(en)
<i>KanR</i>	Kanamycin-Resistenzgen
<i>Kap.</i>	Kapitel
<i>kb</i>	Kilo-Basenpaar(e)
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharide
<i>Luc+</i>	Reportergen Luciferase
<i>MAPK</i>	<i>mitogen protein activated kinase</i>
<i>MCS</i>	<i>multicloningsite</i>

<i>MHC</i>	<i>major histocompatibility complex</i>
<i>P</i>	Promotor aus SV40
<i>PCR</i>	Polymerase-Ketten-Reaktion
<i>PMA</i>	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
<i>proIL10</i>	Promotor des humanen IL-10 Gens
<i>proSV40</i>	Promotor aus SV40
<i>Prot</i>	Proteinkonzentration in µg/ µl
<i>RA</i>	Rezeptor-Antagonist
<i>RLU</i>	<i>relative light units</i>
<i>RNA</i>	Ribonukleinsäure
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i>
<i>RT</i>	reverse Transkriptase
<i>RTU</i>	entgegen der Kodierungsrichtung eingesetzte 3'UTR des humanen IL-10 Gens
<i>SF</i>	Stimulationsfaktor
<i>SV40</i>	<i>simian virus 40</i>
<i>STAT</i>	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
<i>T</i>	<i>Thymin</i>
<i>Tab.</i>	Tabelle
<i>TGF</i>	<i>transforming growth factor</i>
<i>TNF</i>	Tumornekrosefaktor
<i>Tr1</i>	regulatorische T-Zellen
<i>U</i>	Uracil
<i>UTR</i>	untranslatierte Region
<i>WT</i>	Promotor des humanen IL-10 Gens

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	7
2. EINLEITUNG.....	9
2.1 ZYTOKINE UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DAS IMMUNSYSTEM	9
2.2 DIE ROLLE DER ZYTOKINE BEIM ENTZÜNDUNGSPROZESS	11
2.2.1 <i>Die immunologische Erstreaktion</i>	11
2.2.2 <i>Reaktionen des spezifischen Abwehrsystems</i>	11
2.3 INTERLEUKIN 10 – BEDEUTUNG FÜR DAS IMMUNSYSTEM.....	13
2.3.1 <i>Funktionen und Effekte auf die Zellen des Immunsystems</i>	13
2.3.2 <i>Klinische Aspekte</i>	14
2.4 IL-10 - MOLEKULARE GRUNDLAGEN	17
2.4.1 <i>IL-10 Gen, Protein und Rezeptor</i>	17
2.4.2 <i>Regulation der Genexpression</i>	17
2.4.3 <i>Bedeutung des IL-10 Promotors für die Genregulation</i>	19
2.4.4 <i>Bedeutung der 3'UTR für die Genregulation</i>	20
2.4.5 <i>Die 3'UTR des IL-10 Gens</i>	22
3. ZIELE DER ARBEIT	24
4. MATERIAL UND METHODEN	25
4.1 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	25
4.2 KLONIERUNGEN.....	26
4.2.1 <i>Plasmide</i>	26
4.2.2 <i>Restriktionsspaltung</i>	27
4.2.3 <i>Gelelektrophorese</i>	28
4.2.4 <i>Fragmentreinigung</i>	29
4.2.5 <i>Dephosphorylierung</i>	29
4.2.6 <i>Ligation</i>	30
4.2.7 <i>Transformation und kompetente Zellen</i>	31
4.2.8 <i>Selektion</i>	31
4.2.9 <i>Plasmidpräparationen</i>	31
4.3 ZELLKULTUR	33
4.3.1 <i>Charakterisierung und Kultivierung der Zellen</i>	33
4.3.2 <i>Transfektion der Zellen</i>	34
4.3.3 <i>Stimulation der Zellen</i>	34
4.4 LUCIFERASE ASSAYS	35

4.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	35
5.	ERGEBNISSE.....	36
1.1	DIE HERSTELLUNG DER REPORTERGENPLASMIDE MIT pGL3-PLASMIDEN.....	36
5.1.1	<i>Insertion des SV40-Promotors in pGL3-basic und pGL3-enhancer</i>	<i>36</i>
5.1.2	<i>Isolierung des IL-10-Promoters und Klonierung in pGL3-basic</i>	<i>37</i>
5.1.3	<i>Isolierung der 3'UTR und Klonierung in pGL3-proSV40, pGL3-coSV40 und pGL3-proIL10.....</i>	<i>39</i>
5.1.4	<i>Überprüfung der Klonierungen durch Restriktion</i>	<i>41</i>
5.2	BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION DER REPORTERPLASMIDE IN LUCIFERASE ASSAYS.....	45
5.2.1	<i>Einfluss der 3'UTR des IL-10-Gens auf die Aktivität eines heterologen Promotors</i>	<i>46</i>
5.2.2	<i>Einfluss der 3'UTR des IL-10 Gens auf die Aktivität des autologen Promotors.</i>	<i>51</i>
6.	DISKUSSION.....	57
6.1	EINFLUSS DER 3'UTR AUF DIE GENEXPRESSION IN PLASMIDEN MIT DEM SV40-PROMOTOR.....	57
6.2	EINFLUSS DER 3'UTR AUF DIE GENEXPRESSION IN PLASMIDEN MIT DEM IL-10 PROMOTOR	59
6.3	EINFLUSS DER 3'UTR AUF DIE GENEXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ORIENTIERUNG	61
6.4	HINTERGRÜNDE UND MECHANISMEN DES EINFLUSSES DER 3'UTR AUF DIE GENEXPRESSION	61
6.5	KLINISCHE RELEVANZ UND AUSBLICK	63
7.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	67
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
9.	ANHANG.....	76
9.1	DANKSAGUNG	76
9.2	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	77
9.3	LEBENS LAUF.....	78

1. Zusammenfassung

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Molekülen, die bei der Interaktion der Zellen des Immunsystems und der damit ausgelösten Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen. Ein Gleichgewicht aus immunstimulierenden und immunhemmenden Substanzen ist hierbei Voraussetzung für eine kompetente Abwehrreaktion des Organismus.

Interleukin 10 ist ein Immunmodulator, dessen Serumkonzentration bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) und atopischen Erkrankungen verändert ist. Seine anti-inflammatorischen Eigenschaften und die Fähigkeit zur Beeinflussung des Verhältnisses von verschiedenen T-Zelltypen zugunsten von Th2-Zellen machen eine genauere Betrachtung der Genexpression für Immunologen und Kliniker interessant.

Die Genregulation von IL-10, wie auch von vielen anderen Genen, wird nicht nur vom Promotor, sondern auch von Sequenzen der 3'UTR reguliert:

- Die 3'UTR des IL-10 Gens von Mäusen hat einen hemmenden Einfluss auf die von einem viralen Promotor getriebene Genexpression. Dies wurde in Makrophagen, wie auch in T-Lymphozyten beobachtet.
- Aus weiteren Untersuchungen geht hervor, dass für eine Destabilisierung der mRNA A + U reiche Sequenzen der 3'UTR verantwortlich sind.
- Homologe 3'UTRs anderer Gene regulieren nicht nur posttranskriptional die Stabilität der mRNA, sondern greifen auch in Mechanismen der Transkription ein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der 3'UTR des humanen IL-10 Gens auf die Expression in Reportergenkonstrukten untersucht. Die erzielten Ergebnisse ergänzen insbesondere die zum Promotor/ *enhancer* vorhandenen Erkenntnisse:

- Die 3'UTR des humanen IL-10 Gens hat einen hemmenden Einfluss auf die von einem viralen Promotor und dem nativen Promotor getriebene Expression von Reportergenen in T-Lymphozyten und Monozyten/ Makrophagen.
- Mit einem viralen Promotor fällt dieser Effekt in weniger differenzierten Zellen geringer aus.
- Eine Stimulation der Genexpression führt zu einer Zunahme des hemmenden Einflusses der 3'UTR.
- Die Stimulationsfähigkeit von Zellen mit der 3'UTR ist geringer als ohne.

- Durch Verwendung von Konstrukten mit der 3'UTR und dem IL-10 Promotor konnte gezeigt werden, dass in Monozyten ein signifikant hemmender Effekt auf die Genexpression erst bei erhöhten cAMP Spiegeln auftritt.
- In myelo-monozytären Zellen und T-Zellen hat eine Stimulation der Genexpression keinen Einfluss auf den hemmenden Effekt durch die 3'UTR. Er beträgt hier etwa 50%.
- Die Orientierung der 3'UTR ist nicht relevant für die Beeinflussung der Genexpression.

Die gemachten Beobachtungen lassen Schlussfolgerungen auf nicht direkt untersuchte Mechanismen der Signaltransduktion zu und geben Anlass zu weitergehenden Untersuchungen:

- Neben dem hemmenden Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression deutet sich eine Interaktion zwischen 3'UTR und dem Promotor an. So besteht ein deutlicher Unterschied zwischen der Hemmung der Genexpression bei Verwendung eines viralen Promotors und des IL-10 Promotors mit der 3'UTR. Dementsprechend reguliert die 3'UTR nicht nur posttranskriptional die Stabilität der mRNA, sondern durch einen bis jetzt für noch kein Gen beschriebenen Mechanismus auch die Transkription von IL-10.
- Bei der Verwendung verschiedener Zelllinien wurde gezeigt, dass eine Hemmung durch die 3'UTR in Abhängigkeit vom Zelltyp, dessen Differenzierung, und die Genexpression stimulierender Substanzen variiert. Somit liegt nahe, dass diese Sequenzen auf Umwelteinflüsse reagieren und eventuell schon bekannte Signaltransduktionswege, wie die p38 MAPK benutzen.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass die Genexpression von IL-10 entscheidend von der 3'UTR beeinflusst wird. Eine sich andeutende Interaktion von 3'UTR und Promotor sollte bei zukünftigen Untersuchungen der Genexpression von IL-10, aber auch anderer Gene beachtet werden. Weitere Untersuchungen der komplexen Genregulation von IL-10 durch die 3'UTR und ihren Promotor sind notwendig, involvierte Mechanismen aufzudecken, pathophysiologische Vorgänge besser zu verstehen, und dadurch neue Therapieansätze zu finden.

2. Einleitung

2.1 Zytokine und ihre Bedeutung für das Immunsystem

Das Immunsystem des menschlichen Körpers verfügt als Reaktion auf körperfremde und potentiell pathogene Moleküle und Organismen über verschiedene Abwehrmechanismen. Diese werden in das angeborene bzw. unspezifische Abwehrsystem, zu dem u. a. die Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gehören, und das erworbene bzw. spezifische, zu dem die Lymphozyten zählen, eingeteilt. Die Elemente des angeborenen Immunsystems sorgen zu Beginn einer Infektion dafür, dass durch den Körper als fremd erkannte Partikel durch Phagozytose unschädlich gemacht werden. In einer zweiten Phase wird dann das spezifische Abwehrsystem aktiviert und die Immunantwort in Form Antikörper sezernierender B-Lymphozyten und sich differenzierender T-Lymphozyten fortgesetzt. Diese Vorgänge unterliegen verschiedenen zum Teil sehr empfindlichen Regulationsmechanismen, bei denen vor allem Zytokine eine Rolle spielen.

Zytokine sind eine Gruppe kleiner Peptide (≈ 25 kDa), deren hauptsächliche Aufgabe die Zell-Zell-Kommunikation innerhalb des Immunsystems ist. Sie werden aufgrund ihrer Struktur und Funktion in folgende Gruppen eingeteilt:

- **Hämatopoetine.** Die Gruppe der Hämatopoetine umfasst monomere Substanzen wie Interleukine und verschiedene Wachstumsfaktoren und ist somit in Differenzierungs- und Wachstumsprozesse vor allem hämatopoetischer Zellen, sowie die Steuerung der angeborenen und erworbenen Immunität involviert.
- **Interferone (IFN).** Die Interferone sind homodimere bzw. monomere Substanzen, welche insbesondere bei Virusinfektionen ausgeschüttet werden. $\text{INF-}\gamma$ ist ein wichtiger Aktivator der Makrophagen.
- **TNF-Familie.** Die Substanzen der TNF-Familie sind Trimere und wirken als Immunmodulatoren bei lokalen Entzündungen, der Entwicklung von Lymphknoten, T- und B-Zell-Proliferation und steuern die Apoptose.
- **Chemokine.** Chemokine wirken als Chemoattraktoren für Leukozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten besonders in der Frühphase einer Infektion. Ihre Rezeptoren sind durch sieben membrandurchspannende Helices gekennzeichnet.
- **Weitere.** Daneben gibt es noch Zytokine, die keiner der o. g. Gruppen zugeordnet werden. Dazu gehören Aktivatoren der Immunantwort wie IL-1, IL-12 und IL-17, aber

auch Substanzen mit hauptsächlich immunsuppressiver Wirkung, wie IL-10 oder TGF- β .

Beispiele für zu den entsprechenden Gruppen gehörende Substanzen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Gruppe der Zytokine	Beispiele
Hämatopoetine	Interleukine: IL-2 bis IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-15 Wachstumsfaktoren: Epo, G-CSF, GM-CSF, OSM, LIF
Interferone	IFN- γ , IFN- α , IFN- β
TNF-Familie	TNF- α , TNF- β , Fas-Ligand, LT- β , CD40-Ligand, CD27-Ligand, CD30-Ligand
Chemokine	IL-8, RANTES, MCP-1
Andere	TGF- β , IL-1, IL-10, IL-12, IL-16 bis IL-18, MIF

Tab. 1 Gruppen der Zytokine mit Beispielen. (nach Janeway, 2002)

Die Sezernierung von Zytokinen erfolgt immer auf einen Reiz hin, oftmals auf einen Entzündungsreiz. Sie binden an spezifische Rezeptoren ihrer Zielzellen und wirken autokrin auf sie produzierende Zellen, parakrin auf benachbarte und endokrin auf weiter entfernte Zellen. Im Prinzip sind alle Zellen des Körpers in der Lage, Zytokine zu sezernieren, insbesondere jedoch Zellen des Immunsystems, Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen. Desweiteren besitzen diese Zellen Rezeptoren für bestimmte Zytokine und sind damit auch Wirkort.

Daraus ergeben sich folgende Funktionen der Zytokine:

- Vermittlung der Immunantwort
- Vermittlung und Steuerung der Gewebereaktion auf einen Entzündungsreiz
- Entstehung von Fieber
- Induktion von Akute-Phase-Proteinen
- Chemotaxis
- Regulation der Hämatopoese
- Regulation von Tumorwachstum

All diese Prozesse unterliegen der Steuerung durch Zytokine, welche in einem komplexen Netzwerk zusammenwirken.

2.2 Die Rolle der Zytokine beim Entzündungsprozess

2.2.1 Die immunologische Erstreaktion

In den Körper eindringende Fremdkörper werden sofort von den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems attackiert. Dabei wirken zunächst Gewebsmakrophagen, die durch Phagozytose Fremdkörper aufnehmen. Danach setzen diese Zellen verschiedene Zytokine und Chemokine frei, wodurch die charakteristischen Entzündungsmerkmale *dolor*, *calor*, *rubor* und *tumor* (Schmerz, Hitze, Rötung und Schwellung) hervorgerufen werden. Es folgt eine lokale Gefäßdilatation und damit eine Steigerung der Durchblutung. Makrophagen sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen, wie z. B. IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α . Diese Produkte unterstützen die Entzündungsreaktion durch ihre chemotaktischen Eigenschaften (IL-8), die Aktivierung von Lymphozyten (IL-1 und IL-6), Aktivierung des Gefäßendothels (TNF- α) oder die Induktion der Differenzierung von CD4-T-Zellen zu Th1-Zellen (IL-12). Systemische Effekte wie die Erhöhung der Körpertemperatur (Fieber) oder die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen durch IL-1 und IL-6, sowie eine Gefäßerweiterung und Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität bis hin zum Schock durch den Verlust von Blutplasma in das Gewebe, und disseminierte intravasale Gerinnung durch eine übermäßige Ausschüttung von TNF- α , können dabei ebenfalls auftreten.

2.2.2 Reaktionen des spezifischen Abwehrsystems

Die zu Makrophagen differenzierten Monozyten aktivieren zusammen mit anderen Zellen durch Antigenpräsentation T-Lymphozyten und initiieren eine Immunantwort mit spezifischen Abwehrmechanismen zur Bekämpfung der Infektion. Diese Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt in den lymphatischen Organen und wird stark von den vorher ausgeschütteten Zytokinen beeinflusst.

Dabei differenzieren sich CD4-T-Lymphozyten hauptsächlich zu Th1- oder Th2-Zellen, wobei aber immer beide Phänotypen entstehen. Th1-Zellen entstehen in Anwesenheit von IL-12 und IFN- γ , unter dem Einfluss von IL-4 und IL-6 findet die Differenzierung zu Th2-Zellen statt. Diese Zytokine werden zum großen Teil von phagozytierenden und Antigen präsentierenden Zellen (APC) in Abhängigkeit der Struktur des vorhandenen Antigens sezerniert. So lösen Viren und einige Bakterien die Produktion von IL-12 und IFN- γ und damit die Differenzierung zu Th1-Zellen aus. Würmer und andere Parasiten induzieren die Produktion von IL-4 und damit eine Differenzierung zu Th2-Zellen. Ein weiterer Faktor ist die Stärke der Bindung des T-Zell-Rezeptors an das von einer APC

präsentierte Antigen. Ist diese sehr fest, so entwickelt sich die naive T-Zelle meist in eine Th1-Zelle, ist sie eher schwach, erfolgt die Differenzierung in eine Th2-Zelle (Janeway, 2002).

Phänotypisch unterscheiden sich Th1- und Th2-Zellen in den von ihnen sezernierten Zytokinen und damit in ihrer Wirkung, d.h. der dadurch ausgelösten Immunantwort (Abb. 1). Die von den Th1-Zellen gebildeten Peptide IL-2, IFN- γ und TNF- β sind potente Aktivatoren von T-Zellen und Makrophagen und regen somit die zelluläre Abwehr an. Die Produkte der Th2-Zellen (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- β) hingegen vermögen die B-Zellen zu Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen anzuregen. Dabei entstehen antigenspezifische B-Lymphozyten und Antikörper sezernierende Plasmazellen, so dass eine humorale Antwort induziert wird (Mosmann and Coffman, 1989; Janeway, 2002).

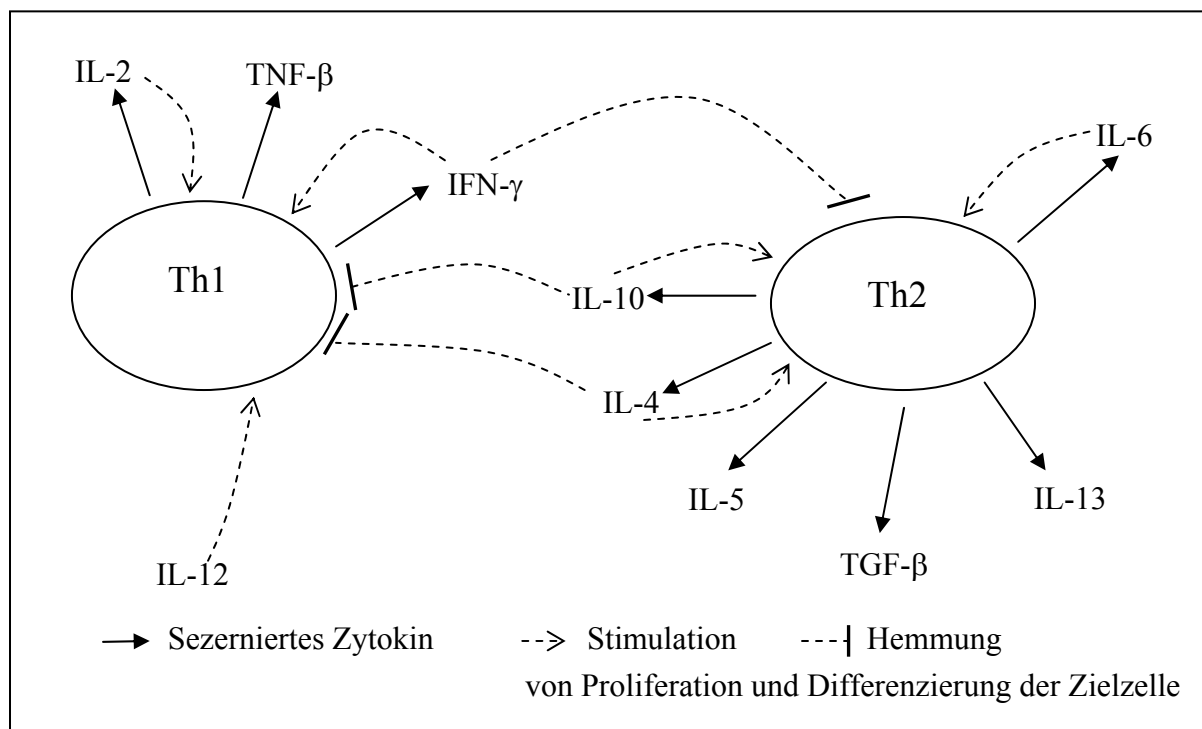


Abb. 1 Die von Th1- und Th2-Lymphozyten sezernierten Zytokine.

Darstellung ihrer Wirkung auf die jeweilige Subpopulation.

Des Weiteren beeinflussen die Produkte der einen Subpopulation die Proliferation der anderen. Das von Th1-Zellen produzierte IFN- γ hemmt die Differenzierung und das Wachstum von Th2-Zellen, IL-4 und IL-10 wiederum hemmen die Th1-Zellen. Trotzdem ist noch einmal zu betonen, dass bei jeder Immunantwort immer beide Zellpopulationen zu finden sind.

So ist festzustellen, dass Zytokine im Verlauf einer Entzündung sowohl bei der Induktion der Immunantwort, als auch bei der Entwicklung und Differenzierung der entsprechenden Komponenten des spezifischen Abwehrsystems eine Rolle spielen.

2.3 Interleukin 10 – Bedeutung für das Immunsystem

Interleukin 10 wurde erstmals im Jahr 1989 als *cytokine synthesis inhibitory factor* beschrieben, welcher von Th2-Zellen von Mäusen sezerniert wird und die Zytokinproduktion von Th1-Zellen hemmt (Fiorentino et al., 1989). IL-10 wird nicht nur von Th2-Zellen, sondern in besonderem Umfang auch von Monozyten und Makrophagen sezerniert. Weitere Produzenten sind B-Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Keratinozyten.

2.3.1 Funktionen und Effekte auf die Zellen des Immunsystems

Monozyten und Makrophagen. Eine Hauptfunktion von IL-10 besteht in der Limitierung der Immunantwort des angeborenen Abwehrsystems. Die immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 kommen vor allem bei Monozyten bzw. Makrophagen zum Tragen.

IL-10 hemmt die Freisetzung entzündungsstimulierender Substanzen, wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 (Fiorentino et al., 1991a; Fiorentino et al., 1991b) und Chemokinen wie Mip-1 und Mip-3, RANTES, IL-8, Gro- α (Moore et al., 2001). Die Expression von MHC-II-Molekülen und damit die Antigenpräsentation wird ebenfalls durch IL-10 gehemmt. Gleichzeitig wird die Produktion von IL-1RA und löslichen TNF-Rezeptoren stimuliert (de Waal Malefyt et al., 1991). Eine übermäßige Verstärkung der Immunreaktion wird verhindert, indem keine weiteren Entzündungszellen durch Zytokine und Antigenpräsentation stimuliert werden. Außerdem wird durch die Hemmung der Chemokinsynthese die Migration der Entzündungszellen zum Infektionsherd unterbunden.

T-Lymphozyten. IL-10 hat ebenfalls auf die Funktion von CD4⁺-T-Zellen einen inhibitorischen Effekt. Durch die verminderte Funktion der antigenpräsentierenden Zellen wird die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen indirekt gehemmt. IL-10 wirkt aber auch direkt an T-Zellen. Es inhibiert die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-2, TNF- α und IFN- γ und ist mit verantwortlich für die Anergie und Inaktivität bereits aktivierter T-Zellen (Groux et al., 1996). Außerdem wird die Differenzierung naiver CD4-T-Lymphozyten in regulatorische T-Zellen (Tr1) befördert, die eine hohe Expressionsrate für IL-10 und TGF- β aufweisen und dadurch wiederum die Proliferation von T-Zellen sowie APC unterdrücken (Moore et al., 2001; Platzer, 2003).

Unter dem Einfluss von IL-10 kommt es zur Hemmung der Zytokinsynthese durch Th1-Zellen. Durch das Überwiegen der von Th2-Zellen ausgeschütteten Zytokine werden B-Zellen aktiviert, mit der Folge einer überwiegend humoralen Immunantwort (Balkwill, 2000).

B-Lymphozyten. Untersuchungen der Effekte von IL-10 auf B-Lymphozyten von Mäusen ergaben ein verlängertes Überleben der Zellen (Go et al., 1990).

Im Unterschied zu Makrophagen und T-Zellen hat IL-10 auf die Funktion von B-Zellen einen stimulierenden Effekt. Es wurde beschrieben, dass unter dem Einfluss von IL-10 die Überlebenszeit von B-Lymphozyten verlängert ist, eine erhöhte Expression von MHC-II-Molekülen unter dem Einfluss dieses Zytokins vorliegt, sowie deren Proliferation und Differenzierung unterstützt wird (Itoh and Hirohata, 1995). Diese Vorgänge gehen mit einer erhöhten Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 einher. Es wurde außerdem ein Synergieeffekt zwischen IL-10 und IL-2 beobachtet, welcher von einer durch IL-10 hervorgerufenen erhöhten Expression des IL-2 Rezeptors gekennzeichnet ist (Fluckiger et al., 1993). Dadurch wird ebenfalls die Proliferation von B-Zellen gesteigert.

2.3.2 Klinische Aspekte

Für Krankheiten, die mit einer Entzündung bzw. Entgleisung der Regulation des Immunsystems einhergehen, wurde versucht, zwischen IL-10 Mangel und Überschuss und deren Pathophysiologie einen kausalen Zusammenhang herzustellen. In diesen Untersuchungen traten besonders die akute systemische Entzündung (Sepsis), chronische Darmerkrankungen (*Inflammatory Bowel Disease, IBD*), wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, Allergien, besonders in Verbindung mit Asthma, aber auch die Psoriasis und Transplantatabstoßungsreaktionen in den Vordergrund.

Akute systemische Entzündung (Sepsis). Dem Entstehen einer akuten systemischen Entzündung und dem Krankheitsbild einer Sepsis geht ein Ungleichgewicht zwischen entzündungshemmenden und entzündungsstimulierenden Mediatoren voraus. Unter dem Einfluss von Abbauprodukten der Erreger, wie z. B. Lipopolysacchariden entwickelt sich eine übermäßige Entzündungsreaktion, welche u. a. durch von Makrophagen und Monozyten ausgeschüttetes TNF- α und IL-1 vermittelt wird (Aries et al., 2001). Danach kommt es zu einer Immunsuppression mit der Gefahr einer Immunparalyse, wie an septischen Patienten beobachtet wurde. Diese Phase wird als Kompensation der vorangegangenen Entzündungsreaktion verstanden und ist durch eine verminderte Ausschüttung von TNF- α einerseits und eine verstärkte Produktion von IL-10 und IL-1

RA andererseits gekennzeichnet ist (Baehr et al., 1989; Kox et al., 2000). Daraus ergibt sich der für die Sepsis beschriebene biphasische Verlauf mit einer kurzen Phase der Hyperinflammation und der Immunsuppression. Diese beiden Stadien sind durch die Ermittlung des Immunstatus des Patienten zu identifizieren, was eine gewisse Bedeutung für die Therapie hat.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Untersuchungen an Mäusen, die selbst kein IL-10 produzieren (IL-10 knockout Maus), zeigten einen Zusammenhang zwischen der Menge an IL-10 im Serum und dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Powrie et al., 1993; Powrie et al., 1994). Dabei wurden bei Versuchstieren, die IFN- γ und TNF- α produzierende T-Lymphozyten injiziert bekamen, eine Enterokolitis festgestellt, welche durch die Gabe von Zytokinantikörpern oder IL-10 verhindert werden konnte.

Vertreter des Formenkreises der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen sind der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa. Im Rahmen der Entzündung kommt es zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, u. a. TNF- α . Als Folge kommt es zu einem Anstieg der IL-10-Synthese, was in den Seren von Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn festgestellt werden konnte. Vermutlich ist dieser Anstieg jedoch nicht ausreichend, um die Entzündung einzudämmen oder erfolgt verspätet, so dass es zum Entstehen des entsprechenden Krankheitsbildes kommt (Kucharzik et al., 1995).

In Studien an Patienten mit aktiver Morbus Crohn Erkrankung wurde durch die systemische Gabe von IL-10 eine Verbesserung des Krankheitsbildes, also eine verminderte Entzündung, erreicht (Schreiber et al., 1995; van Deventer et al., 1997). Dabei konnten auch Patienten erfolgreich behandelt werden, die auf andere Therapien, wie etwa Glukokortikoide, nicht ansprachen.

Psoriasis. Die Pathophysiologie der Psoriasis wird durch das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen und der von ihnen produzierten Menge an IL-10 beeinflusst.

Die aus psoriatischen Läsionen von Patienten gewonnenen T-Zellen weisen eine Sekretion von IFN- γ auf, einem Zytokin, welches von Th1-Zellen produziert wird. Dagegen konnte keinerlei Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-10 nachgewiesen werden (Schlaak et al., 1994). Demzufolge kann man von einem relativen Mangel an IL-10 in der Haut dieser Patienten ausgehen, welcher unter konventioneller Therapie der Psoriasis aufgehoben wurde. In einer weiteren Untersuchung von T-Zellen erkrankter Patienten wurde beobachtet, dass während einer IL-10-Therapie die Sekretion von Th1-Zytokinen

zugunsten der Th2-Zytokine verschoben wurde. Parallel dazu war der klinische Befund nach 24-tägiger subkutaner IL-10-Gabe bei allen Patienten rückläufig und im Anschluss ohne sogenannten *rebound effect* (Asadullah et al., 1998).

Organtransplantationen. Trotz des experimentell nachgewiesenen Einflusses von IL-10 auf T-Zellen, ist dessen Rolle bei Organtransplantationen nicht eindeutig.

In Tierversuchen wurde festgestellt, dass IL-10-Gabe einen günstigen Einfluss auf Transplantatakzeptanz und damit Überleben haben kann, dies jedoch stark von der Menge und dem Zeitpunkt der Applikation abhängig ist (Zou et al., 1998). In einer Pilotstudie an Patienten, die sich einer Nierentransplantation unterzogen und mit OKT 3, einem Immunsuppressivum, behandelt wurden, konnte nur ein Teil der Patienten von einer IL-10-Gabe profitieren (Wissing et al., 1997). Studien weisen darauf hin, dass die Akzeptanz eines Spenderorgans nicht nur von der Funktion der T-Zellen des Empfängers, sondern auch von ihrer Differenzierung in Th1- oder Th2-Zellen abhängt. So wurde eine erhöhte Expression von IFN- γ und IL-2 als ungünstig, von IL-10 und IL-4 als günstig für den Erfolg einer Nierentransplantation beschrieben (D'Elis et al., 1997; Balkwill, 2000).

Atopische Erkrankungen. In den Seren von Patienten, die an atopischer Dermatitis leiden, wurde eine erhöhte Expression von IL-10 nachgewiesen (Ohmen et al., 1995). Aus erkrankter Haut isolierte T-Lymphozyten produzierten neben IL-4 und IL-5 eindeutig mehr IL-10, als aus dem Blut der selben Patienten entnommene Zellen (Gutgesell et al., 1994). Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei dieser Erkrankung das Gleichgewicht zugunsten von Th2-Zellen in der Haut verschoben ist.

Bei Asthmapatienten konnten dagegen Zusammenhänge zwischen verringerter IL-10-Produktion und Erkrankung gefunden werden. Bei Versuchen an Mäusen wurde gezeigt, dass eine Gabe von IL-10 zusammen mit dem asthmaauslösenden Antigen eine normalerweise folgende Neutrophilie, Eosinophilie und TNF- α Produktion unterbindet (Zuany-Amorim et al., 1995). Beim Menschen wurde ebenfalls eine reduzierte IL-10 Produktion der Makrophagen im Sputum von Asthmapatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (Chung, 2001). Unter konventioneller Asthmatherapie stieg der Serumspiegel von IL-10 und die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der Bronchialschleimhaut ging zurück (Stelmach et al., 2002). Eine dem Asthma pathophysiologisch zugrunde liegende Entzündung der Bronchialschleimhaut mit Beteiligung von T-Lymphozyten, Mastzellen und Eosinophilen scheint somit durch IL-10 abgebremst zu werden.

2.4 IL-10 - Molekulare Grundlagen

2.4.1 IL-10 Gen, Protein und Rezeptor

Das IL-10-Gen befindet sich auf dem Chromosom 1q31 – q32 im sogenannten *Cytokine cluster*. In dieser Region sind noch andere Gene der IL-10-Familie, wie z.B. IL-19, IL-20, IL-24, lokalisiert (Platzer, 2003). Das humane IL-10 Gen enthält 5 Exons und wird in eine etwa 2 kb lange mRNA transkribiert (Abb. 2) (Kim et al., 1992).

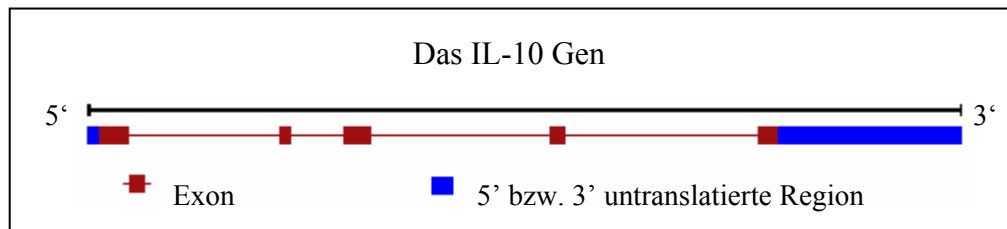


Abb. 2 Schematische Darstellung des menschlichen IL-10 Gens.

Lokalisiert auf dem Chromosom 1q31-q32 mit einer Gesamtlänge von 4891 bp

Interleukin 10 ist ein 18 kDa großes, in Lösung als Homodimer vorliegendes Protein mit einer Länge von 160 Aminosäuren. Im IL-10-Protein wurden zwei funktionsspezifische Domänen identifiziert. Ein Teil besitzt die Fähigkeit zur Inhibierung der Zytokinsynthese, ein anderer Teil scheint die Proliferation von Mastzellen zu regulieren (Gesser et al., 1997).

Der IL-10 Rezeptor besteht aus zwei Ketten, IL-10R1 und IL-10R2, und gehört zur Familie der Interferonrezeptoren. In Anwesenheit von IL-10 lagern sich die zwei Rezeptorketten zusammen und die zytosolständigen Tyrosinkinasen, die zu den Januskinasen zählen, und die Tyrosinkinase 2 werden aktiviert. Durch weitere Phosphorylierung werden STAT-Proteine (*signal transducers and acitvators of transcription*), insbesondere STAT3, aktiviert, welche dann als Transkriptionsfaktoren an verschiedenen Genen wirksam werden (Janeway, 2002).

2.4.2 Regulation der Genexpression

Alle Zellen des menschlichen Körpers enthalten die gleiche DNA. Wie aber kommt es nun dazu, dass sich die Zellen phänotypisch voneinander unterscheiden und auf Signale der Umwelt reagieren können? Die Antwort liegt in der Genregulation. Hier wird bestimmt, welches Gen in welchem Ausmaß exprimiert wird.

Die Genexpression kann auf jeder Ebene der Proteinbiosynthese beeinflusst werden. So wird die Transkription durch die Affinität der RNA-Polymerase zur DNA bestimmt, der Transport der mRNA aus dem Zellkern in das Zytosol, die Translation, der Abbau der

mRNA, sowie die Aktivität des entstandenen Proteins kontrolliert. An dieser Stelle soll besonders auf die Regulation der Transkription sowie die posttranskriptionale Regulation auf der Ebene der mRNA eingegangen werden.

Der wichtigste Einflussfaktor für die Transkription ist die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA und damit ihre Initiation. In Eukaryoten wird ein Gen transkribiert und es entsteht eine mRNA erst, wenn entsprechende Transkriptionsfaktoren in der Zelle bereit gestellt und aktiviert wurden, und zusammen mit der RNA-Polymerase an die DNA gebunden sind. Die Bindung der Moleküle erfolgt an spezifische Sequenzen der Promotorregion eines Gens, d.h. vor dem Start-Kodon. Desweiteren gibt es Genregulatorproteine, die an Enhancer-Sequenzen der DNA binden. Enhancer-Sequenzen mit einer Länge von 50 bis 200 bp befinden sich auf der DNA oft tausende Basenpaare vom Gen, das sie regulieren, entfernt. Durch die Wechselwirkung der gebundenen Proteine mit dem Promotor wird die Initiation der Transkription entscheidend beeinflusst (Alberts et al., 2002; Alberts et al., 2005)

Posttranskriptional finden an der mRNA Prozesse statt, die diese in ihrer Struktur verändern können, die Translation beeinflussen und ihren Abbau kontrollieren. Diese Regulationsmechanismen finden weniger häufig als die der transkriptionellen Regulation statt, sind aber für die Expression einiger Gene von entscheidender Bedeutung. Dazu erfolgt noch im Zellkern das Spleißen, wobei die Struktur des Primärtranskripts durch Spaltung modifiziert wird, sowie das Anheften einer 5'-Cap-Struktur und die Addition eines Poly(A)-Restes. Daneben zeichnet sich die mRNA durch untranslatierte Regionen (UTR) am 5' und am 3' Ende des proteinkodierenden Abschnittes aus (Lodish et al., 2001). Proteine, die an das 5' Ende der mRNA binden oder die Interaktion zwischen 5'*cap* und dem Polyadenylierungssignal durch Bindung an die 3'UTR stören, hemmen die Translation. Das Gen des eisenbindenden Proteins Ferritin ist ein Beispiel für die Stabilisierung bzw. Destabilisierung einer mRNA in Abhängigkeit von der intrazellulären Metabolitkonzentration. Ist viel Eisen in der Zelle enthalten, so wird Ferritin zu dessen Bindung benötigt, wodurch das Auftreten toxischer Konzentration vermieden wird. Verantwortlich für die Aktivierung der Translation ist der Zustand des *iron-response-element*-Bindungsprotein, welches an die 5'UTR bindet und die Translation hemmt. Eine hohe Eisenkonzentration in der Zelle führt aufgrund von Eisenanlagerung zur Deaktivierung des Bindungsproteins. Durch die folgende Dissoziation von der mRNA wird die Translation des Ferritins initiiert (Hentze and Kuhn, 1996).

2.4.3 Bedeutung des IL-10 Promotors für die Genregulation

In der Vergangenheit wurden verschiedene Einflussfaktoren auf die Expression von IL-10 dokumentiert. So sind cAMP-respondierende Elemente (CRE) des Promotor/ *enhancers* und die daran bindenden Transkriptionsfaktoren ATF-1 und CREB-1 für die cAMP-induzierte transkriptionale Aktivierung von IL-10 verantwortlich (Platzer et al., 1999). Eine durch cAMP vermittelte Aktivierung des Promotors ist überwiegend vom Auftreten der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und C/EBP β abhängig. Die Expression von C/EBP und damit die Aktivierung des IL-10 Promotors durch cAMP nimmt mit fortschreitender Differenzierung von Zellen der myelomonozytären Reihe zu (Platzer et al., 1995; Brenner et al., 2003). Im Verlauf einer Entzündung werden, z. B. stimuliert durch bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS), zunächst proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 und GM-CSF synthetisiert, und die Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen. Vermittelt durch Entzündungsmediatoren, wie z. B. Prostaglandine und Katecholamine, wird gleichzeitig die Adenylatcyclase aktiviert, und die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt (Riese et al., 2000). Unter dem Einfluss von C/EBP und cAMP wird daraufhin in den Makrophagen die Expression von IL-10 aktiviert. Mit der kompensatorischen Ausschüttung von IL-10 im Laufe der Entzündung wird die Immunantwort limitiert und die Entzündung geht zurück.

Lipopolysaccharide sind aber auch in der Lage, die IL-10 Expression direkt zu aktivieren. Ein *pathway* verläuft dabei über den Transkriptionsfaktor Sp1, welcher durch das Einwirken von LPS aktiviert wird und in Makrophagen direkt an den Promotor des IL-10 Gens bindet (Brightbill et al., 2000). In einer anderen Untersuchung wurde die Regulation der IL-10 Expression als eine Kombination aus dem Auftreten der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3, die an die spezifische Sequenzen der 5'UTR binden, sowie der Stabilität der mRNA, welche zum großen Teil über die 3'UTR vermittelt wird, dargestellt (Tone et al., 2000).

IL-10 führt zu einer Aktivierung von STAT3, und reguliert durch diesen Mechanismus seine eigene Expression. In Makrophagen, T- und B-Zellen wird die Aktivierung von STAT3 auch durch LPS stimuliert. Interessanterweise führt eine Mutation des STAT3 Gens zu einer erhöhten Expression von IL-10. Schlussfolgernd bewirkt STAT3, welches direkt mit dem IL-10 Promotor interagiert, eine Hemmung der Transkription (Benkhart et al., 2000).

Ein weiterer Aktivator der IL-10 Expression ist das proinflammatorische Zytokin TNF- α . Sowohl in Monozyten *in vitro*, als auch *in vivo* wurde eine Stimulation der IL-10 Synthese

durch dieses Zytokin nachgewiesen. Das bei einer Entzündung massiv ausgeschüttete TNF- α bewirkt durch die Stimulation der Synthese des antiinflammatorisch wirkenden IL-10 ein negatives Feedback, wodurch die Immunantwort wieder herunter geregelt wird (van der Poll et al., 1994; Platzer et al., 1995). Unklar bleibt dabei, ob die intrazelluläre Signalübertragung mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B einhergeht, oder ein davon unabhängiger Mechanismus involviert ist (Mori and Prager, 1997).

2.4.4 Bedeutung der 3'UTR für die Genregulation

Die 3'UTR ist ein Sequenzbereich, welcher sich stromabwärts des Stoppsignals (UGA bzw. UAA auf der mRNA) eines Gens befindet, und unter anderem verantwortlich für die Genregulation auf der Ebene der mRNA ist.

Die Stabilität der zytoplasmatischen mRNAs ist sehr unterschiedlich. Beeinflusst wird diese Stabilität durch die Struktur und verschiedene Elemente der mRNA selbst. Hervor treten dabei Elemente der 3'UTR, wie Kopien des Pentamers AUUUA und A + U reiche Elemente (ARE). Werden diese in eine stabile mRNA am 3'Ende eingefügt, so führt das zu einer bis um das Zehnfache herabgesetzten Halbwertszeit. Nachgewiesen wurde dieser Mechanismus an verschiedenen mRNAs, besonders von Zytokinen (Shaw and Kamen, 1986). Ebenso enthalten 3'UTRs an die Proteine bindende Sequenzen, die die mRNA stabilisieren und somit die Translation und die Entstehung von Proteinen fördern.

Die mRNA des Transferrinrezeptorproteins ist ein Beispiel für diese Regulation. Eine zentrale Rolle spielt dabei das *iron-response-element*-Bindungsprotein, welches auch regulatorisch am Promotor des Ferritins wirksam ist. Es bindet in Abhängigkeit von der intrazellulären Eisenkonzentration an die mRNA. Bei niedrigen Eisenkonzentrationen bindet das Protein an die 3'UTR und moduliert damit unter anderem die für den raschen Abbau verantwortlichen Pentamere AUUUA mit der Konsequenz einer erhöhten Transferrinrezeptorproduktion. Steigt die Eisenkonzentration, dissoziiert das Protein von der mRNA, und gibt die Pentamere frei. Daraufhin nimmt die Abbaurate wieder zu (Hentze and Kuhn, 1996).

Die Bedeutung der 3'UTR für die Genexpression soll zunächst anhand von Erkenntnissen über andere Gene, insbesondere der Zytokine, erläutert werden.

TNF- α . Besonders gut ist die 3'UTR von TNF- α untersucht worden. Reportergenkonstrukte mit dem Promotor und der 3'UTR von TNF- α zeigten abhängig von der verwendeten Zelllinie verschiedene Ergebnisse. In HeLa (aus humanem Cervixkarzinom hervorgegangene Zelllinie), NIH 3T3 (Zellen eines Mausembryos) und

THP-1 Zellen (humane Monozyten) wurde die Expression des Reportergens durch Insertion der 3'UTR verhindert bzw. verringert. Die Zelllinie L-929 (Fibroblasten) zeigte ein anderes Verhalten. Hier wurde bei Einsatz des gleichen Reportergenkonstrukts keine Hemmung der Genexpression beobachtet, was auf unterschiedliche Funktionen der 3'UTR in verschiedenen Geweben und eine Abhängigkeit von intrazellulären Einflussfaktoren hindeutet (Kruys et al., 1992; Seiler-Tuyns et al., 1999).

Desweiteren wurden verschiedene Faktoren identifiziert, die an die 3'UTR und die darin enthaltenen AREs und AUUUA Sequenzen binden. Ein solches Protein, welches die Expression der mRNA durch Bindung daran modifiziert, ist HuR, welches eine sonst instabile TNF- α mRNA in Makrophagen stabilisiert (Fan and Steitz, 1998; Dean et al., 2001; Di Marco et al., 2001). In Makrophagen von Mäusen wurden die eng miteinander verwandten Proteine TIA-1 und TIAR identifiziert, welche sich im Zytosol befinden. Sie binden ebenfalls an spezifische Sequenzen der 3'UTR und führen zu einer Erhöhung der Genexpression von TNF- α (Piecyk et al., 2000).

Eine Destabilisierung der mRNA erfolgt unter anderem unter Mitwirkung von Proteasomen. Diese erkennen spezifische Sequenzen innerhalb der 3'UTR und induzieren nachfolgend deren Spaltung und Abbau (Jarrousse et al., 1999).

Chemokin KC in Mäusen. Die Stabilität der mRNA des Chemokins KC von Mäusen wird in Makrophagen durch verschiedene Einflussfaktoren, die speziell auf die 3'UTR abzielen, reguliert. So wird die mRNA einerseits unter dem Einfluss von IL-1 stabilisiert, eine Zugabe von IL-10 führt hingegen zu einem schnelleren Abbau. Beide Mechanismen sind vom Vorhandensein der 3'UTR sowie auch der 5'UTR abhängig und deuten auf eine ähnliche Regulation in anderen Genen hin (Kishore et al., 1999; Tebo et al., 2000).

Andere. Die Synthese einiger in die Immunantwort involvierter Substanzen, bzw. deren Vorstufen, wie das Akute-Phase-Proteins Amyloid A2, die Cyclooxygenase 2 und die NO₂-Synthase, wird über an die 3'UTR angreifende Mechanismen reguliert. Wie bei TNF- α wurden auch hier mRNA bindende Proteine, wie HuR, TIA-1 und TIAR als Einflussfaktoren identifiziert (Longley et al., 1999; Rodriguez-Pascual et al., 2000; Cok et al., 2003). Diese führen durch Bindung an die 3'UTR zu einer Stabilisierung des Transkripts.

Zusammenfassend unterliegt der Einfluss der 3'UTR verschiedener Gene einer komplexen Regulation. Relevant sind dabei zusätzlich gewebsspezifische Eigenschaften der Zellen und das Vorhandensein von an die 3'UTR bindenden Proteinen in diesen Zellen. Es ist zu

erwarten, dass auch für die 3'UTR des IL-10 Gens der Einfluss auf die Genexpression in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ist.

2.4.5 Die 3'UTR des IL-10 Gens

Allgemeines Die 3'UTR stellt mit einer Länge von etwa 1000 bp den größten Teil des 5. Exons des IL-10 Gens dar. Innerhalb dieses Genabschnittes, welcher zwar transkribiert, aber nicht translatiert wird, und damit nicht für die Proteinstruktur kodiert, befinden sich diverse, für die Regulation der IL-10 Produktion relevante Elemente. Es ist bekannt, dass diese auch in anderen Zytokingenen zu finden sind (Chen and Shyu, 1995).

UGAGACA

```

601 UCAGGGUGGCGACUCUAUAGACUCUAGGACAUAAAUUAGAGGUCUCCAAAAUCGGAUCUG
661 GGGCUCUGGGAUAGCUGACCCAGCCCCUUGAGAAAACCUUAUUGUACCUCUCUUAUAGAAU
721 AUUUAUUACCUCUGAUACCUCAACCCCCAUUUCUAUUUAUUUACUGAGCUUCUCUGUGAA
781 CGAUUUAGAAAAGAGCCCAAUUAUUUAUUUUUUUCAAUAUUUAUUUUUUUCCACUGUUU
841 UUAAGCUGUUUCCAUAAGGGUGACACACUAUGGUUUUGAGUGUUUUAAGAUAAAUAUAA
901 GUUACAUAAAGGGAGGAAAAAAAAAUGUUCUUUGGGAGCCAAACAGAAGCUUCCAUCCAAG
961 CCUGACCACGCUUUCUAGCUGUUGAGCUGUUUUCCCUGACCUCUUAAUUUAUCUUGU
1021 CUCUGGGCUUGGGGCUCCUAACUGCUACAAAUACUCUUAGGAAGAGAAAACCAGGGAGCC
1081 CCUUUGAUGAUUAAUUCACCUUCCAGUGUCUCGGAGGGAUUCCCCUAACCUCAUUCCCCA
1141 ACCACUUCAUUUCUUGAAAGCUGUGGCCAGCUUGUUAUUUAUAACAACCUAUUUUUGGUUC
1201 UAGGCCGGGCGCGGUGGCUCACGCCUGUAAUCCCAGCACUUUGGGAGGCUGAGGCGGGUG
1261 GAUCACUUGAGGUCAGGAGUUCUAAACCAGCCUGGUCAAACAUGGUGAAACCCGUCUCUA
1321 CUAAAAAUACAAAAAUUAGCCGGGCAUGGUGGCGCGCACCUUGUAAUCCCAGCUACUUGGG
1381 AGGCUGAGGCAAGAGAAUUGCUUGAAACCCAGGAGAUGGAAGUUGCAGUGAGCUGAUAUCA
1441 UGCCCCUGUACUCCAGCCUGGGUGACAGAGCAAGACUCUGUCUCAAAAAAUAAAAUAAA
1501 AAUAAAAUUUGGUUCUAAUAGAACUCAGUUUUAACUAGAAUUUAUUCAAUUCUCUGGGAA
1561 UGUUACAUUGUUUGUCUGUCUUCAUAGCAGAUUUUAAUUUUGAAUAAAUAAAUGUAUCUU
1621 AUCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 3 Nukleotidsequenz der 3'UTR des IL-10 Gens auf der mRNA.

Darstellung der Nukleotidsequenz des IL-10 Gens ab dem Stop-Kodon; UGA = Stop-Kodon des IL-10 Gens, Fett = potentiell regulatorisch wirkende AUUUA Pentamere, Unterstrichen = A + U reiche Elemente (ARE), Basen 1626 bis 1655 = posttranskriptional angefügtes Poly-A-Signal (verändert nach Brewer et al., 2003)

Die Sequenz der 3'UTR der mRNA des IL-10 Gens (Abb. 3) weist mehrere an anderen Genen posttranskriptional regulierende Elemente auf. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass sie auch hier für die posttranskriptionale Regulation eine entscheidende Rolle spielen könnten.

Regulation der Genexpression von IL-10 durch die 3'UTR Im Unterschied zur Promotorregion ist der Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression bisher nur wenig

untersucht worden. Arima et al., 1998 berichteten erstmals über eine Beteiligung der 3'UTR an der Regulation der IL-10 Synthese. Spezifisch an Sequenzen der IL-10 3'UTR bindende Oligonukleotide wurden in RAW264.7, einer Makrophagenzelllinie, eingebracht und mit RT-PCR die Menge der IL-10 mRNA bestimmt. In Anwesenheit der Oligonukleotide wurde in den durch LPS stimulierten Zellen weitaus weniger mRNA nachgewiesen als in den Kontrollen, was auf einen schnelleren Abbau hinweist.

Powell et al., 2000 examinierten den Einfluss der 3'UTR des IL-10 Gens der Maus auf einen Standardpromoter in Makrophagen und T-Lymphozyten. Die 3'UTR bzw. Elemente daraus (AU1-4) wurden hinter das Reportergen Luciferase (Luc+) und den Promoter von SV40 kloniert und die Genexpression der verschiedenen Plasmidkonstrukte mittels Luciferaseassays untersucht. In allen Versuchen wurde eine Reduktion der Luciferaseaktivität in den Plasmiden mit 3'UTR gefunden. Diese Ergebnisse wurden durch Quantifizierung der IL-10 mRNA und ELISA nachvollzogen und bestätigt. Demzufolge liegt sowohl in stimulierten, als auch in unstimulierten Makrophagen und T-Lymphozyten eine Destabilisierung der mRNA unter dem Einfluss der 3'UTR vor. Diese Destabilisierung wird einerseits durch die schon zuvor als potentiell destabilisierende Elemente identifizierten A + U reichen Sequenzen erreicht, andererseits konnte kein Abschnitt der 3'UTR eine ähnlich starke Inhibition der Genexpression hervorrufen wie das gesamte Fragment.

Bei der Stimulation von Makrophagen mit LPS und von T-Zellen mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) wurde der hemmende Effekt auf die Genexpression der einzelnen AREs ausgeschaltet und auch die Hemmung der Genexpression durch die gesamte 3'UTR war vermindert. Dies lässt darauf schließen, dass noch andere, insbesondere PMA-respondierende Elemente, in der 3'UTR vorhanden sind, deren Stimulation die Hemmung der Genexpression durch die 3'UTR überwindet.

3. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation wird die 3'UTR (*3'untranslated region*) des humanen IL-10 Gens untersucht. Ziel meiner Arbeit war es herauszufinden, ob die 3'UTR einen Einfluss auf die Genexpression in T-Lymphozyten und Monozyten/ Makrophagen hat.

Dazu sollten folgende Aufgaben erfüllt werden:

1. Herstellung der Reportergenplasmide
 - pGL3-proSV40 (mit SV40-Promotor),
 - pGL3-coSV40 (mit SV40-Promotor und SV40-Enhancer) und
 - pGL3-proIL10 (mit IL-10 Promotor).
 - pGL3-proSV40-UTR
 - pGL3-proSV40-RTU,
 - pGL3-coSV40-UTR,
 - pGL3-proIL10-UTR und
 - pGL3-proIL10-RTU
2. Untersuchung des Einflusses der 3'UTR des IL-10 Gens anhand des Reportergens Luciferase.

Die Untersuchungen sollten Antworten auf folgende Fragen geben:

1. Welchen Einfluss hat die 3'UTR auf die Genexpression von IL-10 in T-Lymphozyten und Monozyten/ Makrophagen?
2. Liegt ein Einfluss sowohl auf die basale als auch auf die stimulierte IL-10 Expression vor?
3. Hat die 3'UTR einen Einfluss auf die Genexpression, die durch einen Fremdpromotor gesteuert wird?
4. Welche Rolle spielt die Orientierung der 3'UTR im Hinblick auf die Beeinflussung der Genexpression?

Die Ergebnisse sollen die bereits vorhandenen Daten über die Expression von IL-10 und die Regulation durch dessen Promotor/ *enhancer* ergänzen und so zum Verständnis der Genregulation dieses Zytokins beitragen.

4. Material und Methoden

4.1 PCR (polymerase chain reaction)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde das zu untersuchende DNA-Fragment, die 3'UTR des IL-10-Gens, aus genomischer DNA isoliert und amplifiziert.

Dabei wurde der zu amplifizierende Doppelstrang zunächst bei 94°C 1 Minute lang denaturiert, danach hefteten sich die sog. Primer (zum Doppelstrang komplementäre Oligonukleotide mit 20-25 bp) an die entsprechenden Stellen an (30 Sekunden bei 53°C). Zur Bestimmung der zu verwendenden Primersequenz wurde einer Internetdatenbank (EMBL) die Sequenz des IL-10-Gens und der 3'UTR entnommen. Die Primer (MWG-Biotech AG) flankieren mit ihrer Sequenz die 3'UTR und enthalten eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XbaI*. Damit wird das Produkt der PCR von Schnittstellen für das Restriktionsenzym *XbaI* flankiert (Abb. 4).

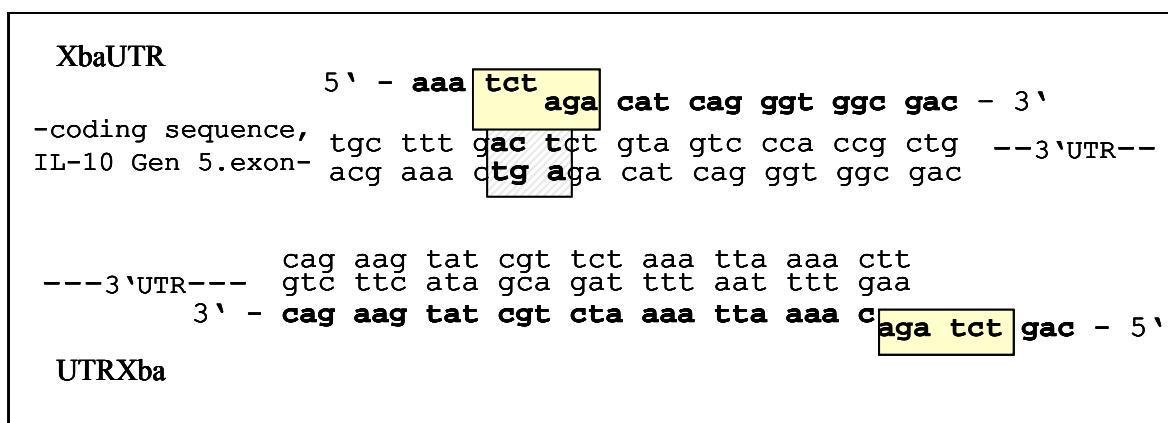


Abb. 4 Anlagerung der Primer am Beginn (XbaUTR) und am Ende (UTRXba) der 3'UTR.

Fett = Primersequenzen,  = Stop-Kodon des IL-10 Gens, farbig unterlegt = Xba-Schnittstelle

Danach wurden die Primer durch eine DNA-Polymerase (Promega) und der Reaktion zugegebene Einzelnukleotide (dNTP) 1 Minute und 30 Sekunden komplementär zum vorliegenden Einzelstrang verlängert (spezifische Optimaltemperatur der verwendeten Polymerase 72°C). Die verwendete DNA-Polymerase war eine Taq-Polymerase. Dieses Enzym aus dem Organismus *Thermus aquaticus* hat den Vorteil, dass es sehr hitzebeständig ist und seine Funktion durch das zyklische Erhitzen des Reaktionsgemisches auf ~90°C nicht verliert.

Der entstandene DNA-Doppelstrang wurde nun wieder denaturiert und der Vorgang begann von neuem. Nach 30 Zyklen erfolgte nochmals eine Erwärmung für 5 Minuten auf

72°C zur Fertigstellung der Elongation und schließlich zur Verhinderung weiterer Reaktionen eine Abkühlung auf 18°C.

Die Amplifizierung der 3'UTR wurde in 25 µl durchgeführt, bestehend aus:

- 1 µl genomische DNA
- 1 µl XbaUTR (Konzentration 10 µM)
- 1 µl UTRXba (Konzentration 10 µM)
- 1 µl dNTP (Konzentration jedes Nukleotids 2,5 mM)
- 2,5 µl 10x Puffer
- 0,25 µl Taq-Polymerase (≅1,25 IU)
- 18,25 µl Wasser

Das Produkt der PCR wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und es entstand pCR2.1-UTR. Das 3,9 kB umfassende Plasmid ist gekennzeichnet durch ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen (AmpR und KanR), welche sich wie später noch beschrieben zur Selektion eignen, sowie eine *multicloningsite* (MCS), in welche das PCR-Produkt kloniert wird.

Schließlich wurde der Vektor pCR2.1-UTR mittels Elektroporation in *E. coli* eingebracht (siehe Kap. 4.2.6).

4.2 Klonierungen

4.2.1 Plasmide

Ausgangsbasis waren die Plasmide pGL3-basic, pGL3-enhancer (Promega), pGL2-control, pGL2-proIL10 und pCR2.1-UTR hergestellt wurden

- pGL3-promoter, hier pGL3-proSV40 (mit SV40-Promotor),
- pGL3-control, hier pGL3-coSV40 (mit SV40-Promotor und SV40-Enhancer) und
- pGL3-proIL10 (mit IL-10-Promoter).

Unter Verwendung der durch PCR amplifizierten 3'UTR wurden die Plasmide

- pGL3-proSV40-UTR
- pGL3-proSV40-RTU,
- pGL3-coSV40-UTR,
- pGL3-proIL10-UTR und
- pGL3-proIL10-RTU

(RTU = entgegen der normalen Kodierungsrichtung 5' – 3' eingesetzte 3'UTR(*antisense*)).
angefertigt.

Alle verwendeten Plasmide enthalten ein Ampicillinresistenzgen (AmpR) und ein für Luciferase kodierendes Gen (Luc+). Am 5'Ende dieses Reportergens befindet sich der virale SV40-Promotor bzw. der IL-10-Promotor, das 3'Ende wird in pGL3-coSV40 vom SV40-Enhancer, in den Plasmiden mit der 3'UTR entsprechend davon gebildet.

4.2.2 Restriktionsspaltung

Die Spaltung von Plasmiden wurde mit einem Restriktionsenzym (Tabelle 2) in einem Volumen von 20 µl ausgeführt. Das Gemisch wurde auf Eis in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Dabei wurde zwischen Ansätzen für analytische und präparative Zwecke unterschieden. Die Menge des verwendeten Enzyms wurde entsprechend der Definition, dass 1 IU Restriktionsenzym 1 µg DNA mit 1 Schnittstelle spaltet, berechnet.

Enzym	Schnittstelle	Firma
HindIII	A [▼] AGCT T T TCGA [▲] A	Gibco
KpnI	G GTAC [▼] C C [▲] CATG G	Promega
SalI	G [▼] TCGA C C AGCT [▲] G	Gibco
SstI	G AGCT [▼] C C [▲] TCGA G	Gibco
XbaI	T [▼] CTAG A A GATC [▲] T	Gibco
XhoI	C [▼] TCGA G G AGCT [▲] C	NEB

Tab: 2 Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme mit DNA-Sequenz der spezifischen Schnittstelle und Firma.

Ein typischer analytischer Spaltansatz, z.B. zur Überprüfung des Erfolges einer Ligation, wurde in 20 µl durchgeführt und setzte sich zusammen wie folgt:

- 500 ng Plasmid (je kleiner das zu erwartende Fragment, desto größer die eingesetzte Menge)
- 0,5 IU Restriktionsenzym
- 2 µl 10x Puffer
- Aqua dest.

Ein Plasmid wurde für präparative Zwecke gespalten, wenn eines der Spaltprodukte für die Konstruktion eines neuen Plasmids (Ligation) verwendet werden sollte.

Aufgrund des zu erwartenden Mengenverlustes durch die nachfolgenden Präparationen wurden mindestens 2 µg Plasmid eingesetzt. Zur Verbesserung des Ergebnisses der Spaltung wurde das Restriktionsenzym im Überschuss dazugegeben (3 - 4 IU).

Bei der Spaltung eines Plasmides mit zwei Enzymen, wurde unterschiedlich vorgegangen:

a) Spalteten beide Enzyme mit annähernd gleich hoher Aktivität in demselben Puffer, wurden beide Enzyme gleichzeitig dazugegeben (je 1 IU Enzym pro µg DNA) und der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert.

b) War dies nicht der Fall, wurde zuerst das Enzym verwendet, welches in dem Puffer höchste Aktivität aufweist, welcher den niedrigeren Salzgehalt hat. Danach wurde die DNA gefällt und gereinigt durch:

Zugabe von 50 µl, 96% Ethanol (\equiv 2,5 Vol %),

Inkubation von 5 Minuten bei -20°C und

Zentrifugation über 10 Minuten bei 12000 rpm.

Der Überstand wurde abgesaugt, das zurückbleibende Pellet der so gereinigten DNA im Reaktionsmix des zweiten Restriktionsenzym resuspendiert und während einstündiger Inkubation bei 37°C erneut gespalten.

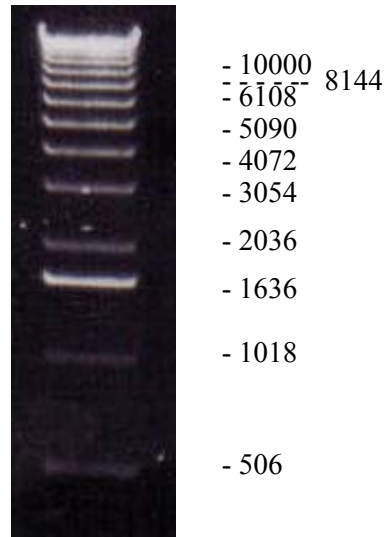
4.2.3 Gelelektrophorese

Zur Analyse und Präparation der DNA-Fragmente, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel (1 g Agarose auf 100 ml Trisacetat-Puffer, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) mit Schlitten zum Einbringen der gelösten DNA angefertigt. Die zu analysierende DNA wurde mit Ladepuffer (Mischung aus Bromphenolblau, Xylencyanolblau und Ficoll) versetzt und in die Schlitze eingebracht. Danach wurde über dem in Trisacetatpuffer eingebrachten Gel eine Spannung von 80 V angelegt, so dass die aufgetragenen DNA-Fragmente das Gel entsprechend ihrer Größe in Richtung der Anode durchwandern. Anschließend wurden unter UV-Licht die Größe der Banden anhand eines DNA-Molekulargewicht-Standards (Invitrogen, Abb. 5) identifiziert.

Abb. 5
DNA-Molekulargewicht-Standard
im Agarosegel.

Zahlen geben Größe der durch die
 Banden repräsentierten
 DNA-Fragmente an



4.2.4 Fragmentreinigung

Zur Fragmentreinigung wurde der Spaltansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Unter dem UV Licht ließ sich anhand des DNA-Molekulargewicht-Standards (Abb. 5) das gewünschte Fragment identifizieren, mit einem Skalpell das das Fragment enthaltende Stück aus dem Gel herausschneiden und in ein Eppendorf-Gefäß geben. Die Isolierung der DNA erfolgte mit einem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Das Produkt wurde in 50 µl Wasser aufgenommen.

Wurde ein Vektor mit 2 Restriktionsenzymen aufgeschnitten und es entstand dabei ein Restfragment von maximal 100 Basenpaaren, so wurde ein Nucleotide Removal Kit (Qiagen) verwendet. Dabei wurde das Restfragment aus dem Reaktionsgemisch entfernt, ohne dass ein Agarosegel angefertigt werden musste. Das Produkt wurde ebenfalls in 50 µl Wasser aufgenommen.

4.2.5 Dephosphorylierung

Wird ein DNA-Vektor, z. B. pGL3-proIL10, mit nur einem Enzym gespalten und soll eine Ligation mit einem entsprechenden Insert erfolgen, so besteht die Gefahr der Religation des Vektors ohne die erhoffte Aufnahme des Inserts. Um dies zu verhindern wurden die 5'Enden des Vektors vor der Ligation dephosphoryliert. Verwendet wurde dafür eine Phosphatase aus dem Kälberdarm (*calf intestine phosphatase, CIP*).

Nach präparativer Spaltung des Vektors wurde das Restriktionsenzym bei 75°C 10 Minuten inaktiviert. Danach wurde die DNA gefällt (siehe 2.2.1.3). Das DNA-Pellet wurde resuspendiert in 50 µl, bestehend aus 5 µl *CIP*-Puffer (Gibco) und 45 µl Wasser. Es wurde 1 IU *CIP* (Gibco) pro pmol Enden des Vektors hinzugegeben.

Dies soll am Beispiel von pGL3-proIL10 (6200 bp) erläutert werden:

Ausgegangen wird von einem mittleren Molekulargewicht von 330 g/mol pro Nukleotid und damit einem Molekulargewicht von rund $4 \cdot 10^6$ g/mol des Vektors pGL3-proIL10.

Es wurden 4 µg Plasmid eingesetzt, was 1 pmol entspricht, wobei 2 Enden zu berücksichtigen sind. Dementsprechend wurden 2 IU *CIP* eingesetzt.

Die Reaktion fand 30 Minuten bei 37°C statt. Danach wurde *CIP* durch Zugabe von 12,5 µl EGTA (20 mM) 30 Minuten bei 65°C inaktiviert und die DNA gereinigt: Es wurde zweimal 100 µl Phenol/Chloroform und einmal 100 µl Chloroform zugegeben, jeweils 5 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert und der abgenommene Überstand weiter verwendet. Danach wurde 200 µl 96% Ethanol zugegeben, das Gemisch 5 Minuten bei 20°C inkubiert und 10 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das gewonnene Pellet in 30 µl Wasser aufgenommen.

4.2.6 Ligation

Ziel einer Ligation ist die Kombination zweier durch Spaltung erhaltener und aus dem Agarosegel isolierter DNA-Fragmente in einem Molekül. Dabei geht man von einem größeren Fragment, dem Vektor, und einem kleineren, dem Insert, aus. Voraussetzung ist die Kompatibilität der zu ligierenden Enden, welches durch die Spaltung mit entsprechenden Restriktionsenzymen erreicht wurde.

Es wurde T4 DNA Ligase eingesetzt (Promega, Konzentration 3 IU/µl). Dieses Enzym, ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 68000 Da, katalysiert die Ausbildung einer Diesterbindung zwischen der Hydroxylgruppe am 3' und dem Phosphatrest am 5'Ende des Inserts bzw. Vektors. Theoretisch müssten Vektor und Insert in äquimolarem Verhältnis eingesetzt werden. Um jedoch ein optimales Ergebnis zu erreichen, ist es aber notwendig, Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:2 einzusetzen.

Ein Ligationsansatz von pGL3-proIL10 als Vektor (6200 bp) und der 3'UTR (1011 bp) als Insert hatte folgende Zusammensetzung:

- 1,5 µg Vektor
- 0,5 µg Insert
- 2,5 µl Ligasepuffer
- 1 µl T4 Ligase
- Wasser ad 25 µl

Die Bestandteile wurden auf Eis in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und die Reaktion lief über Nacht bei 16°C ab.

4.2.7 Transformation und kompetente Zellen

Nach der Ligation wurden die neu entstandenen Plasmide in Bakterien mittels Elektroporation transformiert und vermehrt.

Die dazu verwendeten Bakterien waren elektrokompetente E. coli DH5 α .

Vor der Elektroporation wurden mit Hilfe einer Nitrozellulosefiltermembran (Millipore) und Wasser durch Dialyse die Salze aus dem Ligationsgemisch entfernt. Danach wurden $1 \cdot 10^9$ Bakterien (50 μ l) in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette (Invitrogen) zusammen mit 1 μ l Ligationsgemisch gegeben.

Danach erfolgte die Elektroporation bei:

- Kapazität 21 μ F
- Spannung 2500 V
- Widerstand 200 Ω

Die Küvette wurde mit 1 ml SOC-Medium (0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) aufgefüllt, der Inhalt in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 37°C 20 Minuten leicht schüttelnd inkubiert.

4.2.8 Selektion

Bei einer Retransformation eines bereits angefertigten Plasmides wurden jeweils 5 μ l und 20 μ l, bei Klonierungen meist 100 – 200 μ l des SOC-Mediums mit transformierten Bakterien auf mit Ampicillin (100 μ g/ml) präparierten Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Da die erwarteten Plasmide ein Ampicillinresistenzgen enthielten, wurde so sichergestellt, dass sich nur Bakterien vermehren konnten, welche mindestens ein erfolgreich ligiertes Plasmid enthielten.

Zur weiteren Vermehrung der DNA wurden bis zu 18 verschiedene Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher in je 3 ml LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, Ampicillinkonzentration 0,1 mg/ml) aufgenommen und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

4.2.9 Plasmidpräparationen

Plasmidpräparation mit Phenol/ Chloroform (Minipräparation) Zur Gewinnung der in den Bakterien vermehrten Plasmid-DNA zu Analysezwecken wurden die abzentrifugierten Bakterien (5 Minuten, 6000 rpm, 4°C) zunächst der alkalischen Lyse unterzogen (Lösungen 1-3, Tabelle 3) und die DNA mittels Phenol/Chloroform, Isopropanol und

Ethanol präpariert (Birnboim and Doly, 1979) und in 50 µl TE-RNase (30 µg/ml) aufgenommen.

Plasmidpräparation mit Cäsiumchlorid-Gradienten-Zentrifugation

(Maxipräparation) Um eine größere Menge DNA zu erhalten, wurden Bakterien aus 200 ml LB-Medium aufbereitet. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (20 Minuten, 9000 rpm, 4°C, Zentrifuge Sorvall RC-5B, Rotor GS-3) und nach der oben genannten Methode lysiert (Tabelle 3).

Reagenz	Minipräparation	Maxipräparation
Wasser	100 µl gut homogenisieren	8 ml homogenisieren und 10 Minuten bei RT inkubieren
Lösung 2	200 µl schwenken	16 ml schwenken und 10 Minuten auf Eis inkubieren
Lösung 3	150 µl schütteln Zentrifugation 5 Minuten bei 12000 rpm	12 ml schütteln, 10 Minuten auf Eis inkubieren, Zentrifugation 15 Minuten bei 5000 rpm, 4°C
Isopropanol	300 µl Zentrifugation 5 Minuten bei 12000 rpm	22 ml 10 Minuten bei RT inkubieren Zentrifugation 15 Minuten bei 5000 rpm, 4°C Pellet in 10 ml TE lösen
Phenol/ Chloroform	200 µl Zentrifugation 5 Minuten bei 12000 rpm	Entfällt
Ammonium acetat	entfällt	1,9 g 5 Minuten auf Eis inkubieren Zentrifugation 5 Minuten bei 5000 rpm, 4°C Fällen der DNA mit 2,5 Vol 96% Ethanol
	Pellet mit 70% Ethanol waschen	

Tab. 3 Lyse von E. coli zur DNA-Präparation in Mini- und Maxipräparation.

nach Birnboim and Doly, 1979

Das Plasmid wurde in 3,2 ml TE-Puffer gelöst, 4,4 g CsCl und 0,4 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, luftblasenfrei in ein OptiSeal-Tube (13 x 48mm, Vol 4,9 ml, Beckmann) überführt und mindestens 6 h bei 65000 rpm und 17°C (Ultrazentrifuge Beckmann I-70, Rotor VTi 65.2) zentrifugiert. Es entstand ein CsCl-Gradient, in welchem sich die Plasmid-DNA in der Region mit einer Dichte von 1,391-1,393 g/ml anreicherte.

Nach der Zentrifugation wurde unter UV-Licht das als Ring sichtbare Plasmid mit einer Kanüle abgesaugt. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde die Plasmidlösung mindestens dreimal mit gleichem Volumen n-Butanol ausgeschüttelt und die DNA

anschließend mit 0,6 Vol Isopropanol gefällt. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation von 20 Minuten bei 4000 rpm bei 4°C wurde das Pellet in 300 µl TE gelöst, 2,5 Vol 70% Ethanol zugegeben und wieder 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das nach der Zentrifugation (20 Minuten, 4000 rpm, 4°C) getrocknete Pellet wurde in 200-500 µl TE aufgenommen, die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm im Spektrophotometer UV-1601 (Shimadzu) bestimmt und unter sterilen Bedingungen auf 1 µg/µl eingestellt.

Alternativ zur CsCl-Gradienten-Methode wurde bei einer weiteren Präparation der Plasmide der Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Das Produkt wurde in 200 µl TE-Puffer gelöst.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Charakterisierung und Kultivierung der Zellen

Zur weiteren Analyse der hergestellten Plasmidkonstrukte wurden die Zelllinien HL-60, THP-1 und Jurkat verwendet (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ).

Alle Zelllinien wurden ursprünglich aus Patientenblut isoliert, HL-60 von einem 35-jährigen Patienten mit myeloischer Leukämie, THP-1 von einem einjährigen Jungen mit monozytärer Leukämie und Jurkat von einem 14-jährigen an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten.

Damit entspricht die HL-60 Zelllinie einem unreiferen Entwicklungsstadium in der myelomonozytären Reihe als die THP-1-Zelllinie. Jurkat folgt nicht dem monozytären Entwicklungsarm, sondern dem lymphozytären und ist somit getrennt zu betrachten.

Alle drei Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, feuchte Atmosphäre) in Kulturflaschen (Greiner) in einem Volumen von 30-50 ml und einer Konzentration von $0,5-1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Das Zellkulturmedium RPMI 1640 VLE (*very low endotoxin*, Biochrom) enthielt 10% FKS (fetales Kälberserum, Biochrom) und 100 IU Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Sigma). Die Zellsuspension wurde alle 24-48 h 1:1 geteilt und frisches Nährmedium hinzugefügt. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet.

4.3.2 Transfektion der Zellen

Mit Hilfe der Transfektion wurden die Zellen dazu gebracht, ein Plasmid aus der Umgebung aufzunehmen.

Dazu wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen in 250 μ l Medium aufgenommen, zusammen mit 10 μ g Plasmid (Konzentration 1 μ g/ μ l) in eine 0,4 cm Elektroporationsküvette gegeben und unter folgenden Bedingungen elektroporiert:

- Kapazität 1200 μ F
- Spannung 300 V
- Widerstand 100 Ω

Danach wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml zu je 1 ml in 24 well Platten (Greiner) gegeben und 24 h mit bzw. ohne Stimulus inkubiert.

4.3.3 Stimulation der Zellen

Zur Simulation einer *in vivo* stattfindenden Entzündungsreaktion und der darauf hin aktivierten Genexpression von IL-10 wurden die Zellen mit cAMP (Sigma), PMA bzw. Ionomycin (Calbiochem) versetzt.

Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung der Proteinkinase A. Durch Phosphorylierung werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche durch Interaktion mit dem IL-10 Promotor eine Aktivierung der Genexpression zur Folge haben (Platzer et al., 1999). PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C, die über Phosphorylierungen ähnlich der Proteinkinase A, allerdings weniger spezifisch, Transkriptionsfaktoren und damit die Genexpression aktiviert (Newton 1995). Das Ionophor Ionomycin (Calbiochem) erhöht die Permeabilität der Zellmembran für Kalziumionen. Der damit verbundene Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration erhöht die Substrataffinität und damit die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch die Proteinkinase C (Leventhal and Bertics, 1993).

Die THP-1 Zellen wurden mit 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M bzw. 1000 μ M membrangängigem dibutyryl-cAMP (Sigma) stimuliert. Nach der Transfektion der HL-60 Zellen wurden 50 ng/ml PMA hinzugegeben, welches nach einer Stunde ausgewaschen wurde. Danach wurden die Zellen 24h mit und ohne Zugabe von 500 μ M cAMP inkubiert. Die Zellen Jurkat wurden in gleicher Weise wie HL-60 behandelt, mit dem Unterschied, dass statt cAMP Ionomycin bis zu einer Konzentration von 0,5 μ g/ml zugegeben wurde.

4.4 Luciferase Assays

Alle Plasmidkonstrukte enthalten das Luciferasegen als Reportergen, d.h. die Luciferaseaktivität gibt quantitativ über die Genexpression des jeweiligen Plasmidkonstruktes in einem definierten Zell- und Stimulationsansatz Auskunft.

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und 50 µl Lysispuffer (Promega) zugegeben. Die Zellen wurden durch Schütteln vollständig lysiert und die Zelltrümmer 2 Minuten bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Substrat der Luciferase ist das Luciferin. Den Empfehlungen der Anleitung zum Luciferase Assay Kit (Promega) folgend, wurden zur quantitativen Messung der Luciferaseaktivität 10 µl des Lysats im Luminometer mit 50 µl Luciferin (Promega) versetzt. Durch die Reaktion von Luciferase mit dem Substrat entsteht eine Lichtemission, welche immer 2 bzw. 10 Sekunden nach Substratzugabe gemessen wurde (AutoLumat LB 953, Berthold Technologies Bad Wildbach). Die erhaltenen Messwerte haben die Einheit RLU (*relative light units*).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat wurde das Spektrophotometer UV-1601 (Shimadzu) verwendet. Dazu wurden 10 µl Lysat mit 1 ml Wasser verdünnt und 1 ml Bradford Reagenz (Sigma) zugesetzt. Nach gründlichem Mischen erfolgte die Messung (Bradford, 1976). Die spezifische Luciferaseaktivität wurde berechnet, indem die RLU zu den Proteinkonzentrationen ins Verhältnis gesetzt wurde.

4.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde das Programm SPSS Version 10.0 für Windows verwendet. Die Signifikanz des Unterschiedes zweier Wertepopulationen wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Dieser nicht-parametrische Test berechnet die asymptotische Signifikanz p zweier unabhängiger Stichproben. Ist $p < 0,05$, so ist der Unterschied der untersuchten Wertepopulationen statistisch signifikant.

Zur Kennzeichnung der Varianz der vorliegenden Messwerte, wurde in Diagrammen die Standardabweichung der Mittelwerte angegeben.

5. Ergebnisse

1.1 Die Herstellung der Reportergenplasmide mit pGL3-Plasmiden

Bei den Klonierungen wurden zunächst alle zur Analyse benötigten und noch nicht vorhandenen Plasmide hergestellt. Alle diese Plasmide enthalten ein für Luciferase kodierendes Gen (Luc+) und ein Ampicillinresistenzgen (AmpR). Sie wurden mit entsprechenden Promotoren stromaufwärts, und mit der 3'UTR des IL-10 Gens stromabwärts des Reportergens versehen. Ziel der Klonierungen war es, die zu untersuchenden Plasmidkonstrukte pGL3-proSV40, pGL3-coSV40, pGL3-proIL10, pGL3-proSV40-UTR, pGL3-coSV40-UTR, pGL3-proIL10-UTR, pGL3-proSV40-RTU und pGL3-proIL10-RTU herzustellen.

5.1.1 Herstellung der Kontrollplasmide durch Insertion des SV40 Promotors in pGL3-basic und pGL3-enhancer

Als Kontrollplasmide waren pGL3-basic, pGL3-proSV40 und pGL3-coSV40 vorgesehen. pGL3-proSV40 enthält stromaufwärts des Luc+ einen viralen Promotor (SV40), pGL3-coSV40 neben diesem Promotor noch eine Enhancersequenz am 3'Ende des Reportergens.

Zur Herstellung von pGL3-proSV40 und pGL3-coSV40 wurde der SV40 Promotor aus dem vorhandenen Plasmid pGL2-control mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *KpnI* herausgeschnitten (Abb. 6) und in die mit den gleichen Enzymen geöffneten Plasmide pGL3-basic bzw. pGL3-enhancer eingefügt (Abb. 7).

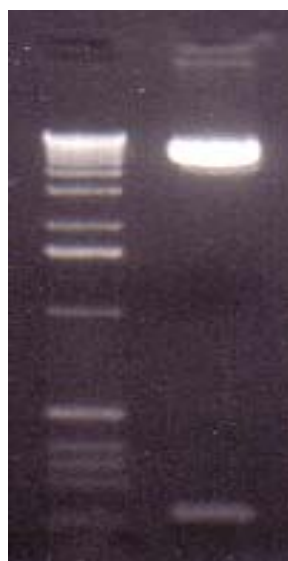


Abb. 6 Agarosegel des präparativen Spaltansatzes von pGL2-coSV40.

Spaltung erfolgte mit *HindIII* und *KpnI*,
Pfeil = isolierter SV40 Promotor mit
233 bp

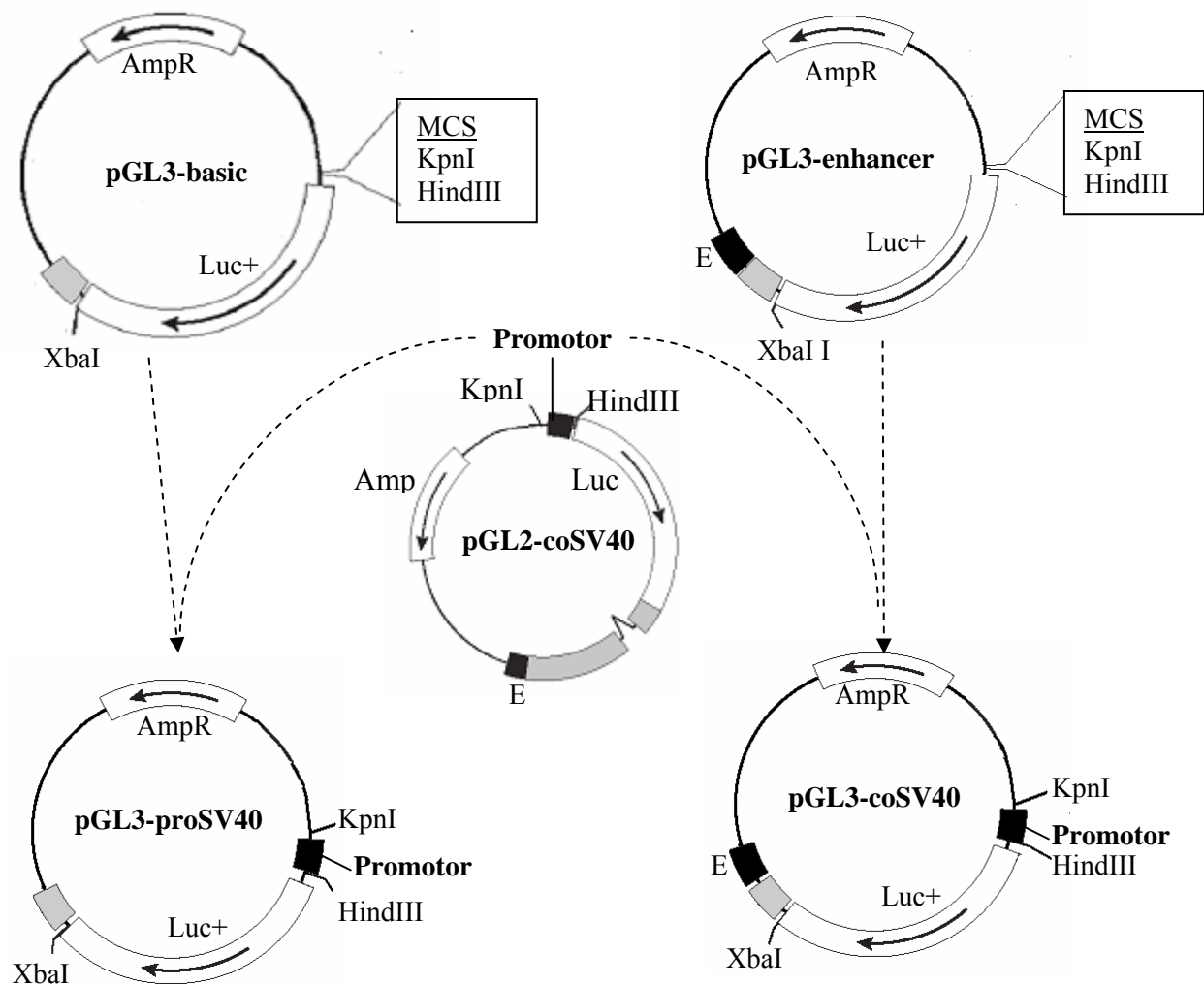



Abb. 7 Herstellung von pGL3-promoter und pGL3-control.

Isolierung des SV40 Promotors aus pGL2-coSV40 *HindIII* und *KpnI* und Klonierung in pGL3-basic und pGL3-enhancer, MCS = *multicloningsite* mit entsprechenden Schnittstellen, E = Enhancer, AmpR = Ampicillinresistenzgen, Luc+ = Luciferasegen,  = Poly-A-Signal

5.1.2 Isolierung des IL-10 Promoters und Klonierung in pGL3-basic

Zur Untersuchung der 3'UTR des IL-10 Gens war es notwendig, auch den IL-10 Promotor in die Untersuchungen mit einzubeziehen, da der Effekt der 3'UTR auf die Genexpression sowohl mit einem Fremdpromotor als auch mit dem IL-10 Promotor analysiert werden sollte.

Hierzu wurde der IL-10 Promotor aus pGL2-proIL10 durch Spaltung des Plasmides mit den Enzymen *XhoI* und *KpnI* isoliert (Abb. 8). Das Empfängerplasmid pGL3-basic wurde mit den gleichen Enzymen eröffnet und das Fragment in einer Ligation eingefügt. Das so entstandene Plasmid wurde pGL3-proIL10 genannt. (Abb. 9).

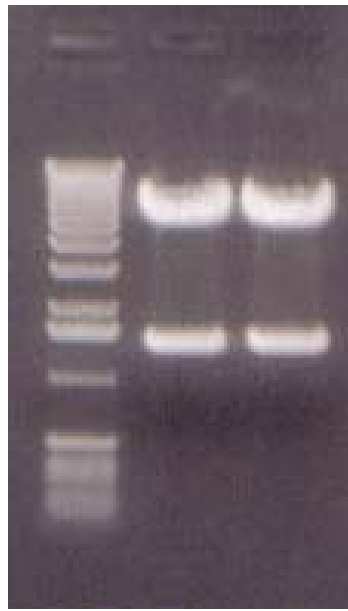


Abb. 8 Agarosegel des präparativen Spaltansatzes von pGL2-proIL10.

Spaltung erfolgte mit *XhoI* und *KpnI*, Pfeil = IL-10 Promotor mit 1490 bp

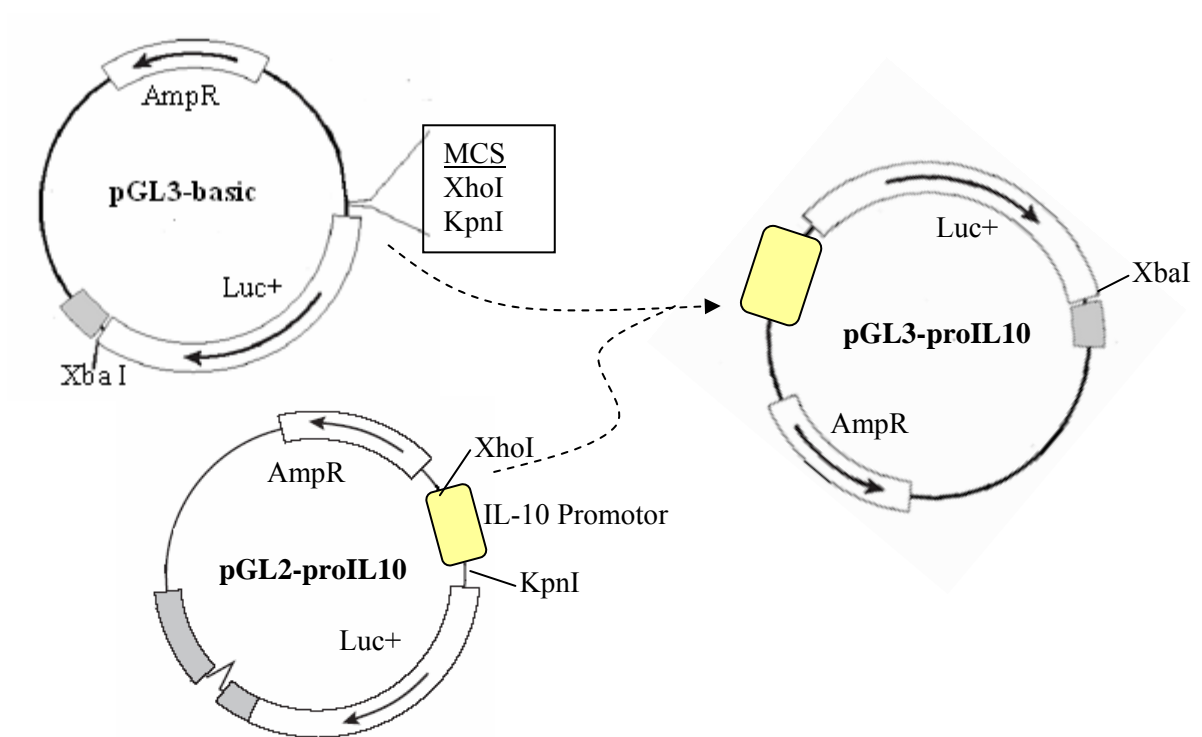



Abb. 9 Klonierung des IL-10 Promotors.

Isolierung aus pGL2-proIL10 und Klonierung in pGL3-basic unter Verwendung der Restriktionsenzyme *XhoI* und *KpnI*, MCS = *multicloningsite* mit entsprechenden Schnittstellen, AmpR = Ampicillinresistenzgen, Luc+ = Luciferasegen,  = Poly-A-Signal

5.1.3 Isolierung der 3'UTR und Klonierung in pGL3-proSV40, pGL3-coSV40 und pGL3-proIL10

Die Untersuchung der 3'UTR des IL-10 Gens sollte in verschiedenen Plasmidkonstrukten erfolgen. Dafür wurde das entsprechende Fragment durch PCR amplifiziert, in den Vektor pCR2.1 kloniert und in die Plasmidkonstrukte pGL3-proSV40, pGL3-coSV40 und pGL3-proIL10 stromabwärts des Luciferasegens eingebracht. Für alle Klonierungen wurde das Restriktionsenzym *XbaI* verwendet, womit die 3'UTR aus dem TA-Vektor herausgeschnitten (Abb. 10) und die Empfängerplasmide aufgespalten wurde.

Durch Ligation entstanden folgende Plasmide, in denen die 3'UTR in Kodierungsrichtung (5' – 3') eingesetzt wurde:

- pGL3-proSV40-UTR (mit viralem SV40 Promotor),
- pGL3-coSV40-UTR (mit SV40 Promotor und Enhancer) und
- pGL3-proIL10-UTR (mit dem IL-10 Promotor).

Außerdem wurden Plasmide isoliert, die die 3'UTR entgegen der Kodierungsrichtung (3' – 5'. RTU) enthielten (pGL3-proSV40-RTU und pGL3-proIL10-RTU; Abb. 11).

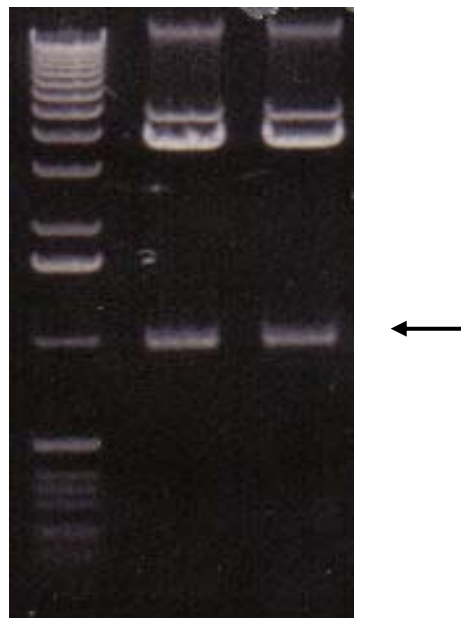


Abb. 10 Agarosegel des präparativen Spaltansatzes des Vektors pCR2.1-UTR..

Pfeil = isolierte 3'UTR mit 1011 bp

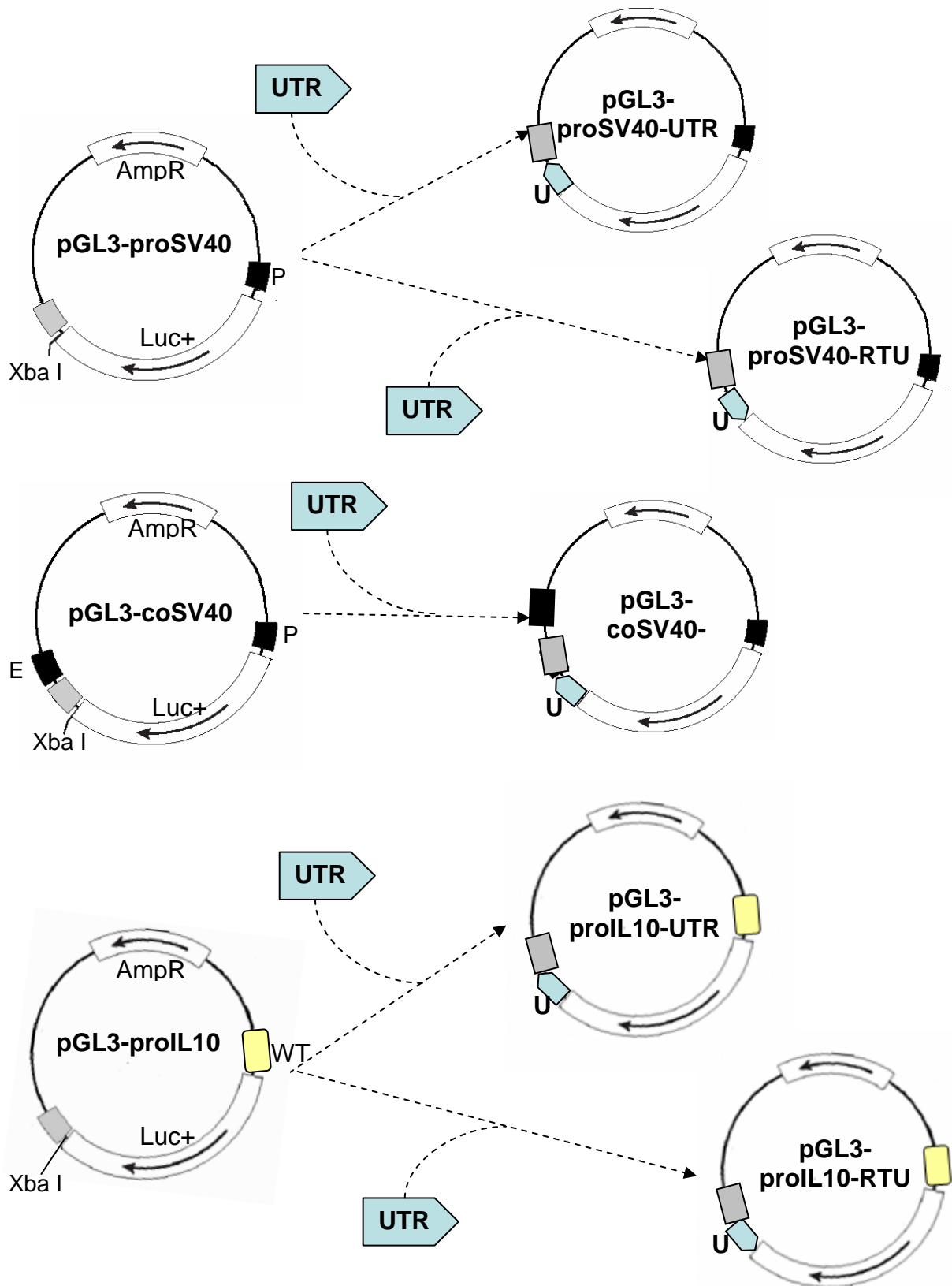




Abb. 11 Klonierung der 3'UTR.

in Kodierungsrichtung  (*sense*) und entgegen der Kodierungsrichtung  (*antisense*) aus dem Vektor pCR2.1 unter Verwendung des Restriktionsenzym *XbaI*

■ P = SV40 Promotor, ■ E = Enhancer, ■ WT = IL-10 Promotor, ■ U = 3'UTR des IL-10-Gens, ■ Poly-A-Signal, AmpR = Ampicillinresistenzgen, Luc+ = Luciferasegen.

5.1.4 Überprüfung der Klonierungen durch Restriktion

Um die Richtigkeit der Klonierungen zu überprüfen, wurden Kontrollspaltungen der hergestellten Plasmide durchgeführt. Die entstandenen Plasmide der Ligationen von pGL3-proSV40 und pGL3-coSV40 mit der 3'UTR wurden mit dem Restriktionsenzym *HindIII* gespalten und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Längen der erhaltenen Fragmente gaben Auskunft über den Erfolg der jeweiligen Ligationen (Tab. 4, Abb. 12).

Bei der Kontrolle der Ligation von pGL3-proIL10 mit der 3'UTR wurde ein anderes Vorgehen gewählt. Dabei wurde in einer ersten Kontrollspaltung *XbaI* verwendet (Abb. 13a). Bei einer erfolgreichen Ligation müsste also das eingefügte Fragment von etwa 1000 bp Länge wie in Reihe 6 wieder erscheinen.

Um auch die Orientierung der 3'UTR in dem Ligationsprodukt feststellen zu können, also um die Frage zu klären, ob pGL3-proIL10-UTR oder pGL3-proIL10-RTU entstanden ist, wurde ein analytischer Spaltansatz der Ligationsprodukte mit *EcoRV* durchgeführt (Abb. 13 b). *EcoRV* spaltet die eingefügte 3'UTR asymmetrisch, d. h. die Spaltungsstelle liegt sehr viel näher am 3' als am 5' Ende der UTR, und hat außerdem eine weitere Schnittstelle im Plasmid. Durch die asymmetrische Spaltung entstehen bei unterschiedlicher Orientierung der 3'UTR im Plasmid bei der Spaltung mit *EcoRV* unterschiedlich große Fragmente, die im Agarosegel identifiziert werden können. Dieser Spaltansatz zeigt Banden von DNA-Fragmenten von etwa 1300bp (c), 2500bp (b) und 3300bp (a). Diese entsprechen jenen Fragmenten, die auch bei der Spaltung von pGL3-proIL10-UTR mit *EcoRV* entstehen (1316 bp, 2574 bp, 3321 bp).

Zum Abschluss wurden nochmals alle Plasmide ihre Identität hin überprüft. Dazu wurden jeweils etwa 1,5 µg DNA mit den Restriktionsenzymen *XbaI*, *SalI* und *SstI* gespalten. Die entstandenen Fragmente (Tabelle 5, Abb. 14) bestätigen den Erfolg der Klonierungen.

Ligationsprodukt	Erwartete DNA-Fragmente in bp			Reihe	Abbildung
pGL3-proSV40			5003	1, 2, 4, 6, 7, 9	12 a
pGL3-proSV40-UTR	2041	3973		3, 8	
pGL3-proSV40-RTU	2348	3666		5	
pGL3-coSV40			5249	1 - 4	12 b
pGL3-coSV40-UTR	2041	4219		5	

Tab. 4 Erwartete Fragmente der Spaltung mit *HindIII* der Ligationsprodukte von pGL3-proSV40.

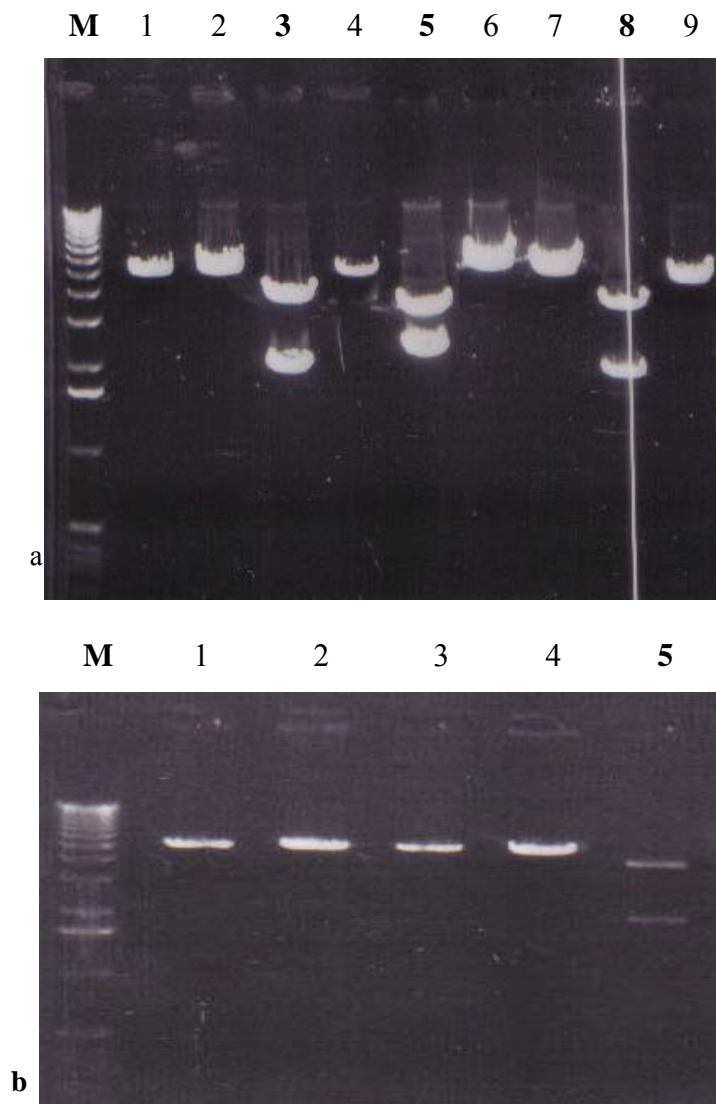


Abb. 12 Kontrollspaltung der Ligation von pGL3-proSV40 und pGL3-coSV40 mit der 3'UTR mit *HindIII*.

M = 1 kB Marker

a) Reihe 1,2,4,6,7,9 = linearisierter pGL3-proSV40, Reihe 3,8 = pGL3-proSV40-UTR, Reihe 5 = pGL3-proSV40-RTU

b) Reihe 1 – 4 = linearisierter pGL3-coSV40, Reihe 5 = pGL3-coSV40-UTR

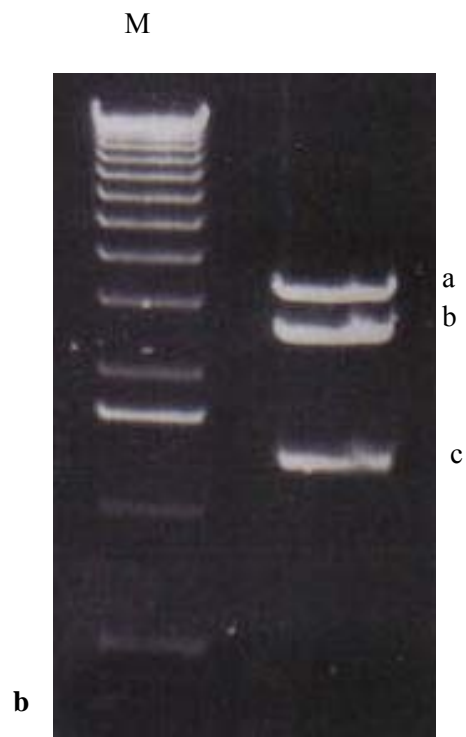
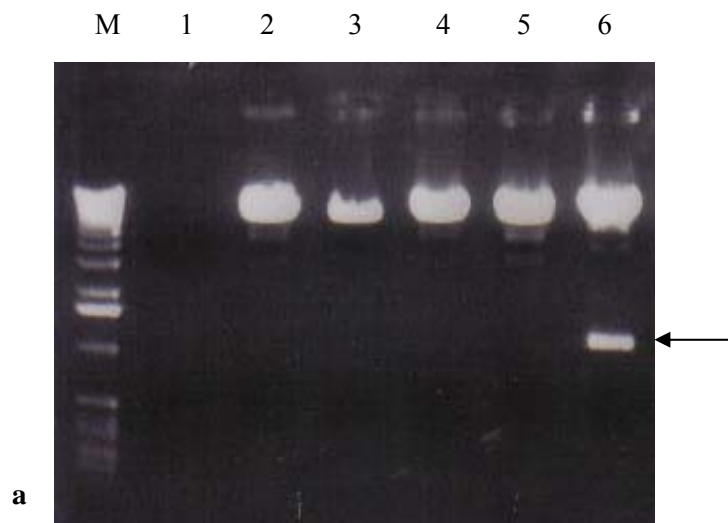


Abb. 13 a und b Kontrollspaltung der Ligation von pGL3-proIL10 mit 3'UTR.

M = 1 kB Marker

- a)** Kontrollspaltung mit *XbaI*, Reihe 1 leer, 2 – 5 = linearisierter pGL3-proIL10 mit 6200 bp, 6 = linearisierter pGL3-proIL10 und 3'UTR mit 1011 bp (Pfeil)
- b)** Spaltung von Reihe 6 mit *EcoRV*, Abbildung entspricht erwarteten Fragmenten für pGL3-proIL10-UTR, a =: 3321 bp, b = 2547 bp, c = 1316 bp

Tab. 5 Erwartete Fragmente aller verwendeten Plasmide.

Spaltung mit den Restriktionsenzymen *XbaI*, *Sall* und *SstI*

Nr	Gespaltenes Plasmid	Erwartete DNA-Fragmente in bp						
1	pGL3-basic	268				1731		2819
2	pGL3-proIL10	268			1187		1926	2819
3	pGL3-proIL10-UTR	268		1011	1187		1926	2819
4	pGL3-proSV40	268					1916	2819
5	pGL3-proSV40-UTR	268		1011			1916	2819
6	pGL3-enhancer		514			1731		2819
7	pGL3-proIL10-enh		514		1187		1926	2819
8	pGL3-coSV40		514				1916	2819
9	pGL3-coSV40-UTR		514	1011			1916	2819

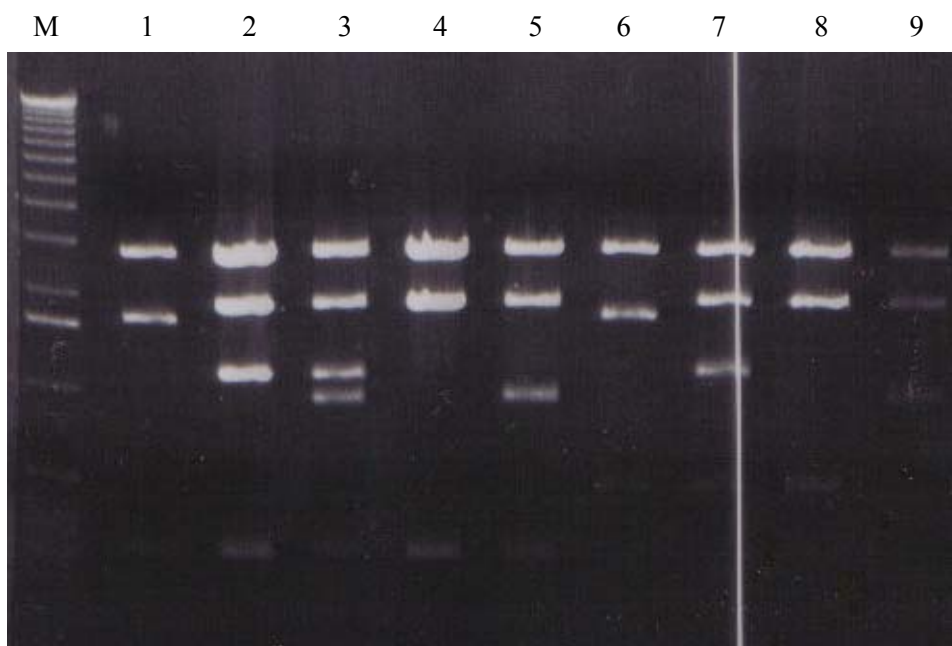


Abb. 14 Spaltung aller verwendeten Plasmide mit *XbaI*, *Sall* und *SstI*.
M = 1kB Marker

5.2 Bestimmung der Genexpression der Reporterplasmide in Luciferase Assays

In den Luciferase Assays wurde die Aktivität der Luciferase in den Zelllysaten, die mit dem jeweiligen Plasmid transfiziert worden waren, gemessen. Um gewisse Schwankungen in der Zellzahl an verschiedenen Tagen, bei unterschiedlichen Stimuli und Zelllinien auszugleichen, wurden zum einen mindestens vier Versuche durchgeführt, zum anderen der Proteingehalt jeder Probe und damit die spezifische Luciferaseaktivität berechnet (Formel 1), sowie weitere Vergleichswerte prozentual bestimmt (Formel 2 und 3). Dabei wird von der spezifischen Luciferaseaktivität ausgegangen, welche der Aktivität der Genexpression durch das jeweilige Plasmid entspricht.

$$\frac{\text{Messwerte des Lucimeters (RLU)}}{\text{Gesamtprotein (Prot)}} = \text{RLU/Prot}$$

Formel 1 Berechnung der spezifischen Luciferaseaktivität (RLU/Prot).

RLU = *relative light units*, Prot = Proteinkonzentration in µg/ µl

Beim Vergleich der Versuchsergebnisse sind zwei Aspekte zu berücksichtigen. Zum einen wird der Einfluss der 3'UTR auf die Luciferaseexpression bestimmt, und zum anderen die Stimulierbarkeit der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von Plasmid und Zelllinie beurteilt.

Um eine Aussage über den Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression treffen zu können, wurde das Verhältnis der spezifischen Luciferaseaktivität des Plasmides mit der 3'UTR zu der ohne 3'UTR gebildet. Dieses wurde in Prozent angegeben, sagt also aus, wieviel Prozent Genexpression im Plasmid mit 3'UTR im Vergleich zum Kontrollplasmid ohne die 3'UTR vorhanden ist (Formel 2). Die Genexpression im Kontrollplasmid entspricht 100%, die mit der 3'UTR entsprechend mehr oder weniger.

$$\frac{\text{RLU/Prot mit 3'UTR (pGL3-proSV40-UTR)}}{\text{RLU/Prot ohne 3'UTR (pGL3- proSV40)}} * 100 = \% \text{ RLU/Prot}$$

Formel 2 Berechnung der Luciferaseexpression in Plasmiden mit der 3'UTR in Prozent.

Die hergestellten Plasmide wurden in den Zelllinien HL-60, THP-1 und Jurkat unter Verwendung verschiedener Stimuli untersucht (Platzer et al., 1999). Die Stimulierbarkeit

des Promotors eines Plasmids wird in Stimulationen (SF) angegeben, welche sich berechnen aus RLU/Prot der jeweiligen Stimulation dividiert durch RLU/Prot der unstimulierten Zellen. Der Wert 1 ist dabei der Ausgangswert (bedeutet also keine Stimulation), ein Wert größer 1 bedeutet eine Stimulation, ein Wert kleiner 1 eine Hemmung der Luciferaseexpression. Dabei wurden allerdings erst Werte größer 2 als Stimulation interpretiert, kleinere Werte wurden als Artefakte verworfen.

$$\frac{\text{SF mit 3'UTR (pGL3-proSV40-UTR)} - 1}{\text{SF ohne 3'UTR (pGL3-proSV40)} - 1} * 100 = \%SF$$

Formel 3 Berechnung des Einflusses der 3'UTR auf die Stimulation.

SF = Stimationsfaktor

Der Einfluss der 3'UTR auf die Stimulierbarkeit des Promotors wird in Prozent angegeben, d. h. der Stimationsfaktor des Plasmides mit der 3'UTR wird mit dem ohne ins Verhältnis gesetzt. Vor der Berechnung werden außerdem beide Werte um den Ausgangswert 1 verringert (Formel 3).

5.2.1 Einfluss der 3'UTR des IL-10-Gens auf die Aktivität eines heterologen Promotors

Einfluss der 3'UTR auf die basale Luciferaseexpression

In allen untersuchten Zelllinien THP-1, HL-60 und Jurkat führt der Einsatz der 3'UTR zu einer Verminderung der basalen Luciferaseexpression. Untersuchungsobjekt waren die Plasmide pGL3-proSV40-UTR und pGL3-proSV40-RTU mit dem SV40 Promotor und der IL-10 3'UTR in der *sense* und *antisense* Orientierung. Kontrollplasmid war pGL3-proSV40, welches nur den SV40 Promotor enthält. Ergänzend wurden Versuche mit pGL3-coSV40-UTR und pGL3-coSV40 in THP-1-Zellen durchgeführt (Tab. 3 und 4).

In den monozytären **THP-1**-Zellen besteht ein starker negativer Einfluss der 3'UTR auf die Luciferaseaktivität (Tab. 3). Die gemessene Luciferaseaktivität beträgt in pGL3-proSV40-UTR mit 76 RLU/Prot gegenüber 798 RLU/Prot im Kontrollplasmid noch 9,5%. Somit bewirkt das Einfügen der 3'UTR eine Hemmung der Expression des Reportergens um 90%. Eine Hemmung ist auch beim Einsatz der 3'UTR in *antisense* Orientierung in pGL3-proSV40-RTU zu verzeichnen. Die Luciferaseaktivität beträgt mit 123 RLU/Prot im Mittel 15% gegenüber dem Kontrollplasmid ohne die 3'UTR (Abb. 15a).

Bestätigt wird der hemmende Effekt der 3'UTR auf die Genexpression durch Verwendung des Plasmides pGL3-coSV40-UTR. Gegenüber dem Plasmid ohne die 3'UTR liegt eine Luciferaseaktivität von 32% vor (Abb. 15b).

In **HL-60**-Zellen, welche in der myelomonozytären Reihe der Hämatopoese als weniger differenziert als THP-1 einzuordnen sind, konnte ebenfalls eine deutliche Abnahme der Luciferaseexpression unter dem Einfluss der 3'UTR nachgewiesen werden.

Um einen Einfluss der Präparation auf die Versuchsergebnisse auszuschliessen, wurde eine zweite Plasmidpräparation mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche der mit der Cäsiumchloridpräparation hergestellten Plasmide wurden verifiziert. Hierbei unterschieden sich die Einflüsse der 3'UTR zwischen beiden Präparationen nicht, so dass die Ergebnisse in einem Mittelwert zusammengefasst sind.

Insgesamt ist der hemmende Effekt der 3'UTR in dieser Zelllinie jedoch nicht so stark wie in THP-1. Die Luciferaseexpression in pGL3-proSV40-UTR liegt bei 70%, die Aktivität in Plasmiden mit der *antisense* Variante der 3'UTR liegt mit 45% deutlich darunter (Abb. 16a).

Die Versuche mit der T-Zelllinie **Jurkat** ergaben eine deutliche Hemmung der basalen Luciferaseexpression. Plasmide mit der 3'UTR in und entgegen der Kodierungsrichtung weisen, wie in THP-1-Zellen, nur noch 11% bzw. 9% Luciferaseaktivität auf (Abb. 16b).

Einfluss der 3'UTR auf die stimulierte Luciferaseexpression

Die Luciferaseexpression in stimulierten **HL-60**-Zellen mit pGL3-proSV40-UTR ist gegenüber pGL3-proSV40 reduziert. Die Luciferaseaktivität in Zellen mit der 3'UTR beträgt 61%. Analog zu den Ergebnissen ohne Stimulation ist die Hemmung der Genexpression bei Verwendung der *antisense* Variante in pGL3-proSV40-RTU ausgeprägter. Die Luciferaseaktivität beträgt hier noch 37% (Abb. 16a).

Durch die Stimulation von HL-60-Zellen mit PMA wurde bei den untersuchten Plasmiden eine deutliche Erhöhung der Luciferaseaktivität erreicht, welche unter Zugabe von cAMP noch gesteigert werden konnte. Die mittleren Stimulationsfaktoren mit PMA und cAMP liegen zwischen 4,55 (pGL3-proSV40) und 3,68 (pGL3-proSV40-RTU). Damit bleibt die Stimulation der Genexpression unter dem Einfluss der 3'UTR mit etwa 80% SF leicht hinter der ohne zurück (Tab. 3).

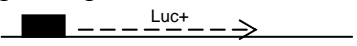
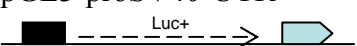
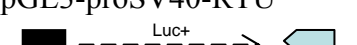
Die stimulierte Luciferaseaktivität ist in **Jurkat**-Zellen mit pGL3-proSV40-UTR gegenüber pGL3-proSV40 deutlich verringert. Es liegt eine stimulierte Luciferaseaktivität von 9% in Zellen mit der 3'UTR vor, was nahezu identisch mit den Ergebnissen in

unstimulierten Zellen ist. Bestätigt wird diese Beobachtung durch eine Aktivität von 7% im Plasmid mit der entgegen der Kodierungsrichtung eingesetzten 3'UTR (Abb. 16b).



In den mit PMA und Ionomycin stimulierten Jurkat-Zellen wurden im Mittel in fünf Versuchen Stimulationsfaktoren von maximal 3,46 festgestellt (pGL3-proSV40) (Tab. 5). Die Stimulation von Plasmiden mit der 3'UTR war geringer, so dass in pGL3-proSV40-UTR 63% SF und in pGL3-proSV40-RTU 73% SF vorlagen.

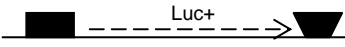
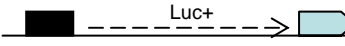
Zusammenfassend ist festzustellen, dass die 3'UTR in monozytären Zelllinien wie THP-1, myelomonozytären Zellen wie HL-60 und in T-Lymphozyten wie Jurkat einen hemmenden Effekt auf die vom SV40 Promotor getriebene Basisexpression und die stimulierte Genexpression hat. Dabei ist die Luciferaseaktivität in HL-60 Zellen am größten, in der Zelllinie THP-1 weist sie nur ein Zehntel und weniger auf. Die Verringerung der Genexpression unter dem Einfluss der 3'UTR ist in den Zelllinien Jurkat und THP-1 etwa gleich stark, in den weniger differenzierten HL-60 Zellen fällt sie geringer aus. Bei Stimulation der Genexpression in diesen Zellen wird der hemmende Einfluss der 3'UTR allerdings größer.

Desweiteren ist zu beobachten, dass auch die Stimulation der Genexpression von Plasmiden mit dem SV40 Promotor durch die 3'UTR beeinflusst wird. Sowohl in den monozytären HL-60 Zellen, als auch in der T-Zelllinie Jurkat sind die Stimulationsfaktoren in Plasmiden mit der 3'UTR geringer als in solchen ohne.




<u>Plasmid</u>	<u>THP-1</u>	<u>HL-60</u>		<u>Jurkat</u>	
	Basisakt.	Basisakt.	stim. Akt.	Basisakt.	stim. Akt.
pGL3-proSV40 	798	8350	38021	4208	14570
pGL3-proSV40-UTR 	76	5988	23103	490	1254
pGL3-proSV40-RTU 	122	3798	13961	355	997
	n=4	n=5		n=5	

Tab. 3 Basale und stimulierte Luciferaseaktivität mit dem SV40 Promotor und der IL-10 3'UTR in den Zelllinien THP-1, HL-60 und Jurkat.

Darstellung der Mittelwerte der relativen Luciferaseaktivität in RLU/Prot aus 4 bzw. 5 unabhängigen Versuchen (n). Basisakt. = unstimulierte Luciferaseexpression, stim. Akt. = stimulierte Luciferaseexpression,  SV40 Promotor,  3'UTR.

Plasmid	THP-1
pGL3-coSV40 	1915
pGL3-coSV40-UTR 	609
	n=8

Tab. 4 Luciferaseaktivität in pGL3-coSV40 und pGL3-coSV40-UTR in THP-1 Zellen.

Darstellung der Mittelwerte der relativen Luciferaseaktivität in RLU/Prot.
n = Anzahl der eingegangenen Versuche,
 SV40 Promotor,  3'UTR,
 SV40 Enhancer.

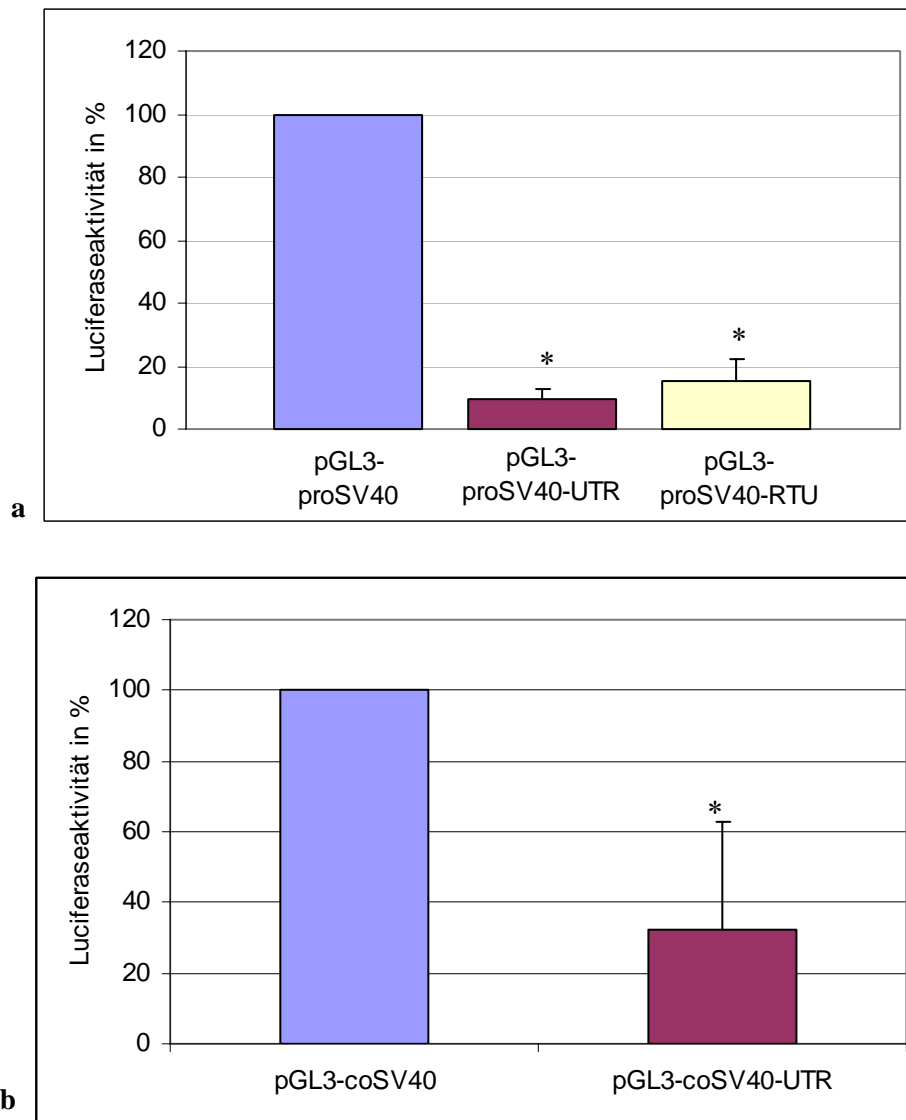


Abb. 15 Einfluss der 3'UTR auf die durch den SV40 Promotor getriebene basale Luciferaseexpression in THP-1-Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. * Bei diesen Werten besteht nach Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zum Plasmid ohne 3'UTR.

- Einfluss der 3'UTR in pGL3-proSV40-UTR und pGL3-proSV40-RTU in 4 unabhängigen Versuchen.
- Einfluss der 3'UTR in pGL3-coSV40-UTR in 8 unabhängigen Versuchen.

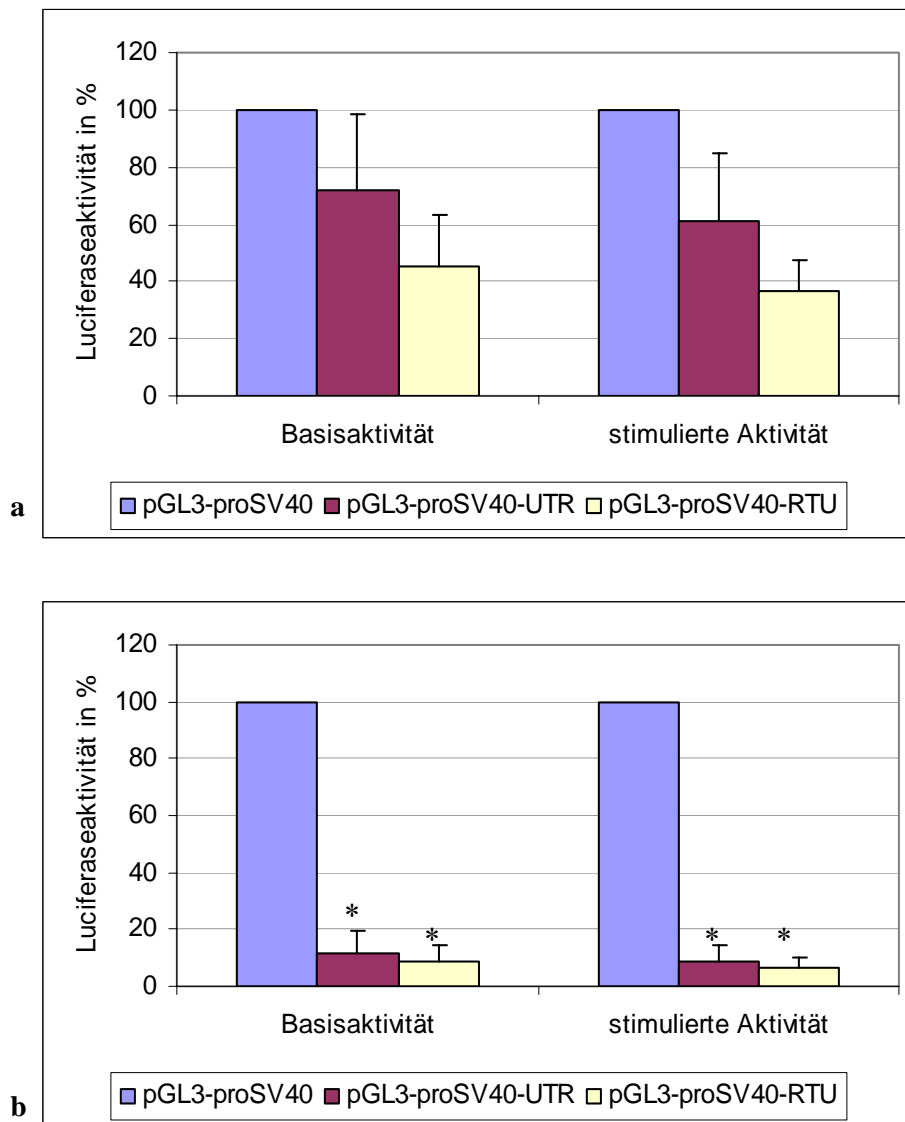


Abb. 16 Einfluss der 3'UTR auf die Luciferaseexpression in pGL3-proSV40-UTR und pGL3-proSV40-RTU.

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung in 5 unabhängigen Versuchen.

* Bei diesen Werten besteht nach Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zum Plasmid ohne 3'UTR.

- a) basale und stimulierte Aktivität in **HL-60**-Zellen.
- b) basale und stimulierte Aktivität in **Jurkat**-Zellen.

Plasmid	HL-60		Jurkat	
	SF	%SF	SF	%SF
pGL3-proSV40	4,55	100	3,46	100
pGL3-proSV40-UTR	3,86	81	2,56	63
pGL3-proSV40-RTU	3,68	76	2,8	73

Tab. 5 Stimulationsfaktoren von pGL3-proSV40, pGL3-proSV40-UTR und pGL3-proSV40-RTU in HL-60 und Jurkat Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen. Ermittlung des %SF entsprechend Formel 3. SF = Stimulationsfaktor.

5.2.2 Einfluss der 3'UTR des IL-10 Gens auf die Aktivität des autologen Promotors

Einfluss der 3'UTR auf die basale Luciferaseexpression

Ein hemmender Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression mit dem IL-10 Promotor konnte ohne Stimulation nicht in allen Zelllinien beobachtet werden.

In den monozytären Zellen **THP-1** liegt die Luciferaseaktivität in pGL3-proIL10-UTR bei 160 RLU/Prot, in pGL3-proIL10 bei 155 RLU/Prot (Tab. 5). Damit besteht weder ein hemmender, noch ein stimulierender Effekt der 3'UTR auf die Genexpression (Abb. 17). In pGL3-proIL10-RTU scheinen die Werte sogar größer zu sein als im Kontrollplasmid.

In **HL-60**-Zellen besteht im Gegensatz zu THP-1 ein hemmender Einfluss der 3'UTR auf die basale Luciferaseexpression. So liegt die Aktivität der Luciferase in Zellen mit den Plasmiden pGL3-proIL10-UTR bzw. pGL3-proIL10-RTU bei 45% und 42% (Abb. 19a). Eine reduzierte Genexpression ist ebenfalls in unstimulierten **Jurkat**-Zellen zu finden. Die Luciferaseaktivität in Versuchen mit Plasmiden mit der 3'UTR in der *sense* Variante beträgt 58%, was durch 56% bei Einsatz der *antisense* Variante untermauert wird (Abb. 19b).

Einfluss der 3'UTR auf die stimulierte Luciferaseexpression

Die Untersuchung der Plasmide mit IL-10 Promotor und der 3'UTR des IL-10 Gens zeigte einen hemmenden Einfluss der 3'UTR auf die stimulierte Luciferaseaktivität, sowie einen Unterschied in der Stimulierbarkeit der Genexpression der mit den verschiedenen Plasmiden transfizierten Zellen.

In den **THP-1**-Zellen ohne Stimulation ist ein Einfluss der 3'UTR in Kombination mit dem IL-10 Promotor praktisch nicht vorhanden. Werden die Zellen mit cAMP stimuliert, so ändert sich der Einfluss. Mit steigender cAMP-Konzentration werden die Messwerte RLU/Prot für Plasmide mit der 3'UTR gegenüber pGL3-proIL10 kleiner (Tabelle 5). Bereits bei einer geringen Stimulation (125 µM) wird im Plasmid mit der 3'UTR eine Abnahme der Genexpression auf 85% deutlich, und nimmt bei der Stimulation mit 500 µM cAMP auf 72,8% weiter ab. Bei der maximal durchgeführten Stimulation mit 1000 µM liegt schließlich nur noch eine Genexpression von 23,9% im Vergleich von pGL3-proIL10-UTR mit pGL3-proIL10 vor (Abb. 17).

Die in THP-1-Zellen durchgeführte Stimulationsreihe zeigt bis zu einer cAMP-Konzentration von 500 µM einen kontinuierlichen Anstieg der

Stimulationsfaktoren in Zellen mit als auch ohne die 3'UTR. Die Zellen mit pGL3-proIL10-UTR konnten im Vergleich zu solchen mit pGL3-proIL10 nicht so stark stimuliert werden. Hier divergieren die Stimulationskurven bei steigender cAMP-Konzentration. Das bedeutet, dass die Stimulationsfaktoren des Plasmides mit 3'UTR relativ weniger zunimmt, als die von pGL3-proIL10. Bei Zugabe von 125 μ M cAMP liegt die Stimulation von pGL3-proIL10-UTR bei 66% SF und mit 500 μ M bei 63% SF. In der letzten Stufe der Stimulation (1000 μ M cAMP) wird für pGL3-proIL10-UTR keine weitere Steigerung der Genexpression erreicht, wobei noch 15% SF vorliegen (Abb. 18).

In den ebenfalls zur myelomonozytären Zellreihe gehörenden **HL-60**-Zellen findet in Plasmiden mit 3'UTR eine schwächere Genexpression statt, als in solchen ohne. Dieser Effekt ist im Gegensatz zu THP-1-Zellen schon ohne Stimulation sichtbar und wird dadurch geringfügig verstärkt. Mit der 3'UTR beträgt die stimulierte Genexpression 38,5%. Die Aktivität mit der entgegen der Kodierungsrichtung eingesetzten 3'UTR entspricht mit 43,5% in etwa den Ergebnissen von pGL3-proIL10-UTR (Abb. 19a).

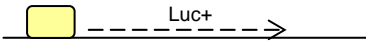
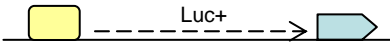
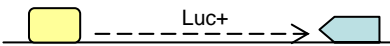
Bei Stimulation der Genexpression in HL-60 konnte kein eindeutiger Einfluss der 3'UTR auf den Stimulationsfaktor nachgewiesen werden. Zwar ist in pGL3-proIL10-UTR ein leichter Rückgang des Stimulationsfaktors gegenüber dem Plasmid ohne 3'UTR zu verzeichnen, dieser ist aber in pGL3-proIL10-RTU nicht reproduzierbar und statistisch nicht signifikant. (Abb. 20a).

Die Abnahme der Genexpression in Zellen mit Plasmiden mit 3'UTR, also pGL3-proIL10-UTR, ist in der T-Zellreihe **Jurkat** auch sichtbar. Die mit PMA und Ionomycin stimulierte Genexpression ist durch die 3'UTR in *sense* Richtung mit 48% und *antisense* mit 37% Luciferaseaktivität gegenüber dem Plasmid ohne die 3'UTR deutlich gehemmt (Abb. 19b).

In Jurkat konnte ebenfalls eine geringere Stimulation mit PMA und Ionomycin für pGL3-proIL10-UTR gegenüber pGL3-proIL10 nachgewiesen werden. Aufgrund der Verringerung der Stimulationfaktoren im Plasmid mit der 3'UTR liegt die anteilige Stimulation von pGL3-proIL10-UTR bei 81% SF, in pGL3-proIL10-RTU liegt der Wert mit 55% SF noch darunter (Abb. 20b).

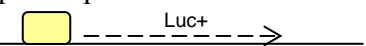
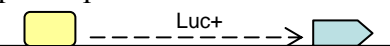
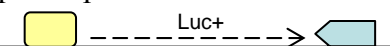
Insgesamt ist die Luciferaseexpression in Zellen mit Plasmiden mit 3'UTR geringer, als in solchen ohne 3'UTR. Somit scheint es, als ob die 3'UTR auch auf den IL-10-Promotor eine hemmende Wirkung hat und diese durch Stimulation noch verstärkt wird (HL-60 und Jurkat-Zellen), bzw. wie in THP-1-Zellen dadurch erst in Erscheinung tritt.

Parallel dazu geht auch die Stimulation unter Einfluss der 3'UTR auf den IL-10 Promotor in allen drei Zelllinien zurück. Dieser Rückgang ist jedoch in der T-Zelllinie Jurkat gegenüber den Zellen der myelomonozytären Reihe THP-1 und HL-60 vergleichsweise gering.



Plasmid	THP-1				
	Basisakt.	Stimulation mit cAMP (in μM)			
pGL3-proIL10 	155	125	250	500	1000
pGL3-proIL10-UTR 	160	256	292	552	417
pGL3-proIL10-RTU 	267				
	n=15	n=7			

Tab. 5 Basale und mit cAMP stimulierte Luciferaseaktivität mit dem IL-10 Promotor und der 3'UTR in THP-1-Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Luciferaseaktivität in RLU/Prot aus 15 bzw. 7 unabhängigen Versuchen (n).

Plasmid	HL-60		Jurkat	
	Basisakt.	stim. Akt.	Basisakt.	stim. Akt.
pGL3-proIL10 	1002	1350	55	286
pGL3-proIL10-UTR 	450	520	31	138
pGL3-proIL10-RTU 	418	583	32	105
	n=5		n=6	

Tab. 6 Basale und stimulierte Luciferaseaktivität mit dem IL-10 Promotor und der 3'UTR in den Zelllinien HL-60 und Jurkat.

Dargestellt sind die Mittelwerte in RLU/Prot aus 5 bzw. 6 unabhängigen Versuchen (n).
Basisakt. = unstimulierte Luciferaseexpression, stim. Akt. = stimulierte Luciferaseexpression,
 IL-10 Promotor,  3'UTR.

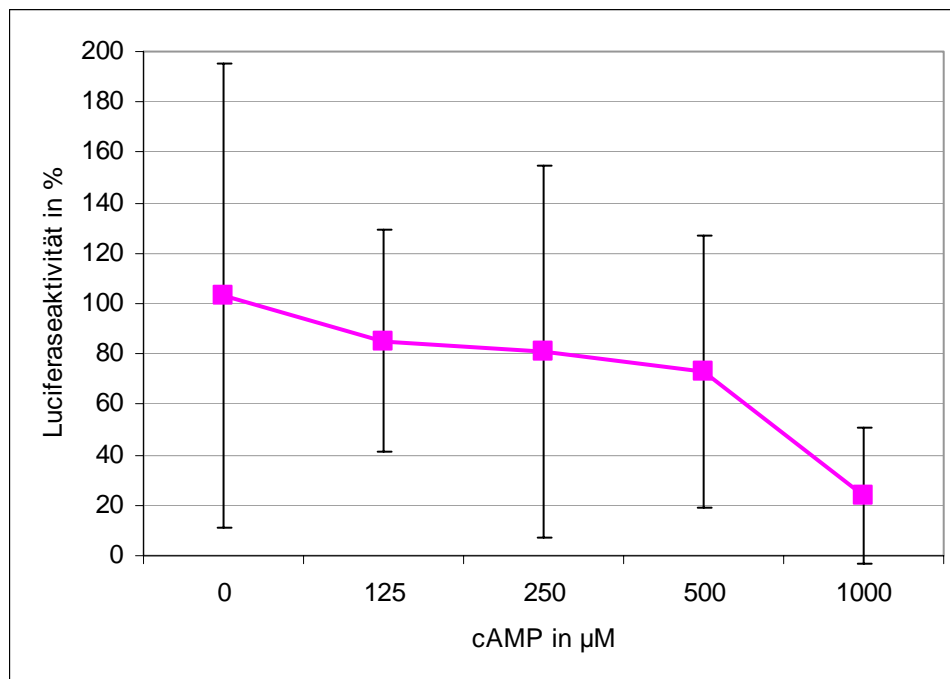


Abb. 17 Einfluss der 3'UTR auf die stimulierte Luciferaseaktivität in pGL3-proIL10-UTR in THP-1-Zellen.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die Luciferaseaktivität in pGL-proIL10 entspricht 100%.

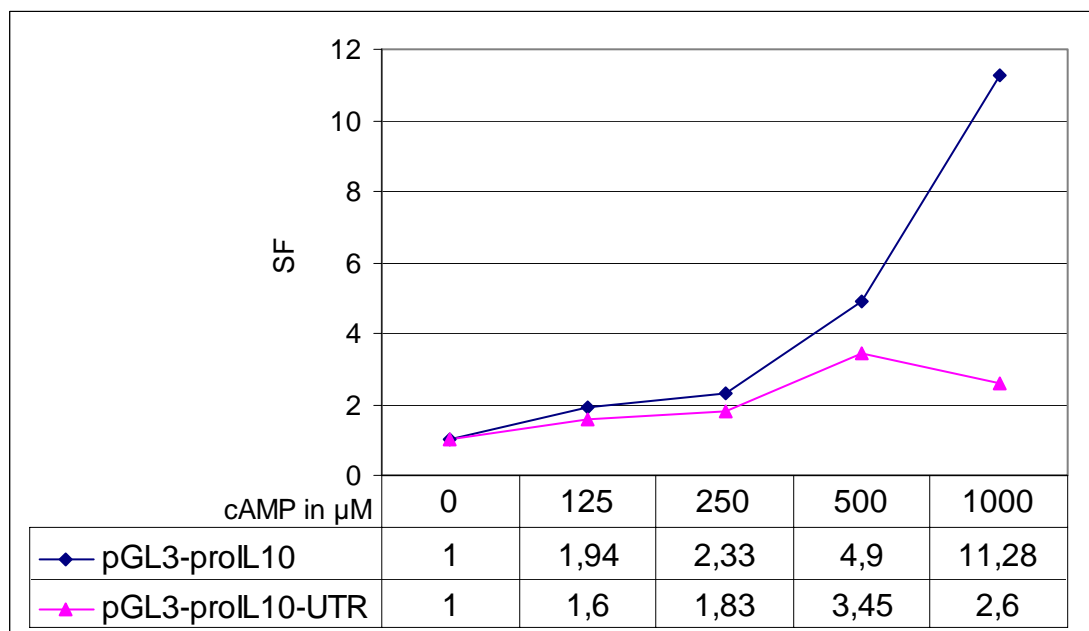


Abb. 18 Einfluss der 3'UTR auf die Stimulierbarkeit pGL3-proIL10 und pGL3-proIL10-UTR in THP-1 in Abhängigkeit von der Stärke des Stimulus.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulationsfaktoren bei steigender cAMP-Konzentration aus 7 unabhängigen Versuchen.

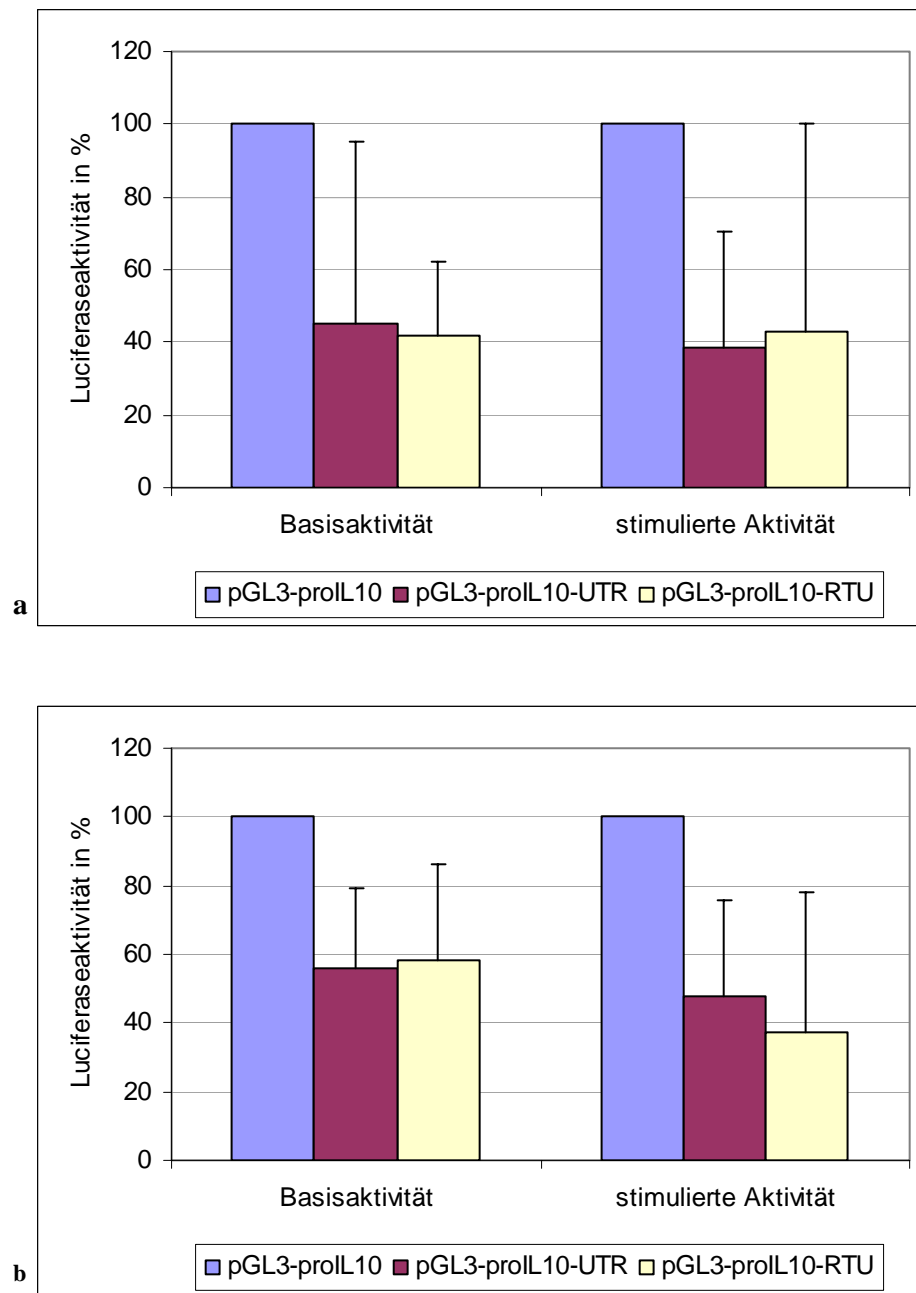


Abb. 19 Einfluss der 3'UTR auf die Luciferaseexpression in pGL3-proIL10-UTR und pGL3-proIL10-RTU.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der Luciferaseaktivität. Die Luciferaseaktivität in pGL3-proIL10 entspricht 100%, die anderen Werte entsprechen Tabelle 6.

- a) basale und stimulierte Aktivität in **HL-60** Zellen aus 5 unabhängigen Versuchen.
- b) basale und stimulierte Aktivität in **Jurkat** Zellen aus 6 unabhängigen Versuchen.

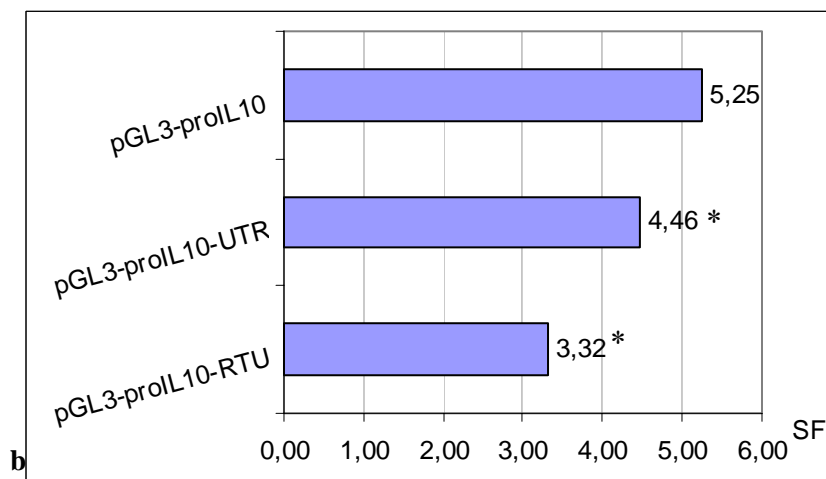
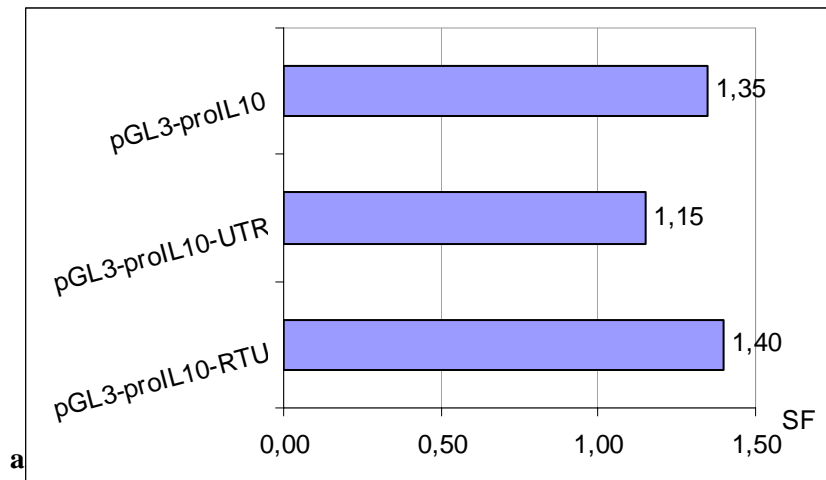


Abb. 20 Einfluss der 3'UTR auf die Stimulierbarkeit von pGL3-proIL10, pGL3-proIL10-UTR und pGL3-proIL10-RTU.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulationsfaktoren. * Bei diesen Werten besteht nach Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zum Plasmid ohne 3'UTR.

- a)** Stimulationsfaktoren in **HL-60** Zellen aus 5 unabhängigen Versuchen.
- b)** Stimulationsfaktoren in **Jurkat** Zellen aus 6 unabhängigen Versuchen.

6. Diskussion

Zahlreiche klinische Studien weisen darauf hin, dass IL-10 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung verschiedener Krankheiten spielt. Die Untersuchungen zur Genexpression dieses Zytokins beschränkten sich bislang fast ausschließlich auf die Promotorregion. Daneben häufen sich aber Hinweise, dass die 3'UTR ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Genregulation von IL-10 spielt und diese auch pathophysiologische Relevanz hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression des Reportergens Luciferase in pGL3-Plasmidkonstrukten untersucht. Ziel war es, den Einfluss der 3'UTR des humanen IL-10 Gens auf den viralen Promotor SV40 und den IL-10 Promotor zu ermitteln. Dies erfolgte in zur myelomonozytären Reihe zählenden Zelllinien THP-1 und HL-60, sowie der T-Zelllinie Jurkat. Ergänzt wurden die Ergebnisse durch die Untersuchungen des Einflusses der 3'UTR bei stimulierter Genexpression. Die verwendeten Zelllinien gehören zum Immunsystem des Menschen, sezernieren zum einen IL-10 und sind zugleich auch Wirkort.

Der hohe Anteil der in der 3'UTR von IL-10 konservierten Gensequenzen (Chen and Shyu, 1995) lässt vermuten, dass sich die Ergebnisse bereits durchgeführter Untersuchungen der 3'UTRs anderer Gene mit denen dieser Arbeit vergleichen lassen.

6.1 *Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression in Plasmiden mit dem SV40-Promotor*

Zunächst wurde der Einfluss der 3'UTR auf den viralen Promotor SV40 untersucht. Gegenüber dem relativ schwachen IL-10 Promotor ist der Promotor aus SV40 ein Promotor mit starker konstitutiver Aktivität. Die Verwendung dieses Promotors hat den Vorteil, dass Effekte auf die Genexpression genauer zu ermitteln sind. Andererseits spiegeln die Ergebnisse dieser Untersuchungen *in vitro* die tatsächlichen Verhältnisse *in vivo* nur bedingt wieder, da derartige Genkonstrukte dort nicht vorkommen.

Die Untersuchungen ergaben, dass sowohl die Stimulation der Zellen, als auch die Genexpression selbst durch die IL-10 3'UTR modifiziert wird.

Die Genexpression ist in allen untersuchten Zelllinien mit der 3'UTR geringer als in Zellen mit dem Kontrollplasmid, und das sowohl mit als auch ohne Stimulation. Damit konnten mit der 3'UTR des humanen IL-10 Gens ähnliche Effekte wie mit der 3'UTR von Mäusen in T-Zellen nachgewiesen werden (Powell et al., 2000).

Mit 3'UTRs anderer Gene wurden ähnliche Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund der Sequenzhomologien mit der 3'UTR des humanen IL-10 Gens können sie Hinweise auf

eventuelle Parallelen des Einflusses dieser Genabschnitte geben. Studien der humanen 3'UTR von TNF- α mit dem CMV (Zytomegalievirus) Promotor in Makrophagen und der 3'UTR von COX-2 in dem wie auch hier verwendetem Plasmid pGL3-control in Mesangiumzellen von Ratten ergaben eine Reduktion der Genexpression in Plasmiden mit der 3'UTR gegenüber den Kontrollplasmiden (Seiler-Tuyns et al., 1999; Cok et al., 2003). Versuche mit der 3'UTR des Chemokins KC in Makrophagen von Mäusen lieferten vergleichbare Ergebnisse (Kishore et al., 1999).

Die oft geäußerte Hypothese der Übereinstimmung von Homologien in der Sequenz und der Beeinflussung der Genexpression durch die 3'UTR eines Gens (Chen and Shyu, 1995; Bakheet et al., 2001) wird also von den Ergebnissen dieser Experimente gestützt. Es stellte sich heraus, dass sich die in der humanen 3'UTR des IL-10 Gens konservierten Sequenzen in ähnlicher Weise auf die Genexpression auszuwirken scheinen, wie es von 3'UTRs anderer Gene bereits bekannt ist.

Ergänzend zu diesen Ergebnissen wurde ein Unterschied des Einflusses der 3'UTR in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen herausgearbeitet. In Monozyten und T-Zellen wird die Genexpression bei Einsatz der 3'UTR in Kodierungsrichtung um über 90% gehemmt, wohingegen in den weniger differenzierten HL-60 Zellen dieser Effekt mit etwa 40% sehr viel geringer ausfällt.

Die Elevation der Genexpression durch Stimuli, welche die Promotorsequenzen von SV40 ansprechen, ist bekannt und wird hier auch bestätigt. Unbekannt war aber zunächst, ob auch die Wirkung der 3'UTR von derartigen Faktoren beeinflusst wird. Die Genexpression konnte sowohl in Zellen mit der 3'UTR, als auch ohne stimuliert werden. Mit der 3'UTR fällt diese Stimulation allerdings in allen verwendeten Zelllinien geringer aus. Demzufolge führt die 3'UTR zu einer verminderten Stimulierbarkeit der Genexpression, für welche bis dato lediglich Sequenzen der Promotorregion verantwortlich zu sein schienen.

So scheint es, als ob der hemmende Einfluss der 3'UTR abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen und von den einwirkenden Faktoren bzw. Stimuli ist.

Desweiteren ist davon auszugehen, dass diese untranslatierte Region des IL-10 Gens nicht nur hemmend auf die Genexpression wirkt, sondern dieser Einfluss bei Stimulation auch noch verstärkt wird. Dies kann entweder durch direkte Interaktion mit dem Promotor geschehen, oder als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen verstanden werden.

6.2 Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression in Plasmiden mit dem IL-10 Promotor

Die Beobachtungen der vorangegangenen Experimente mit dem SV40 Promotor haben den entscheidenden Nachteil, dass sich die *in vitro* erzielten Ergebnisse nur bedingt auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen lassen. Deshalb wurde die 3'UTR nicht nur in Plasmiden mit dem SV40 Promotor, sondern auch mit dem humanen IL-10 Promotor untersucht. Im Fokus standen dabei einerseits die Reproduzierbarkeit bereits durchgeführter Versuche mit dem IL-10 Promotor, und andererseits natürlich der Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression im Reporterplasmid pGL3-proIL10-UTR in Monozyten, myelomonozytären Zellen und T-Zellen.

Die mit dem SV40 Promotor beobachteten Effekte konnten mit dem IL-10 Promotor und der 3'UTR teilweise nachvollzogen werden. Es wurde sowohl eine verminderte Genexpression der Zellen, als auch eine verringerte Stimulierbarkeit unter dem Einfluss der 3'UTR beobachtet.

Die Stimulation des IL-10 Promotors in Monozyten durch cAMP ist bereits gut untersucht (Platzer et al., 1999). Die dabei identifizierten cAMP-respondierenden Elemente der Promotor/ *enhancer* Region zusammen mit den Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie sind für eine Erhöhung der Genexpression unter Stimulation verantwortlich. Eine in diesen Versuchen beobachtete deutliche Stimulation der Genexpression konnte hier nicht nachvollzogen werden. Zwar ließ sich ein Anstieg der Luciferaseaktivität verzeichnen, aber der Stimulationsfaktor lag bei maximaler cAMP Stimulation im Durchschnitt bei 11. Auch die anderen Zellreihen HL-60 und Jurkat zeigten eine erhöhte Genexpression mit den Stimulatoren PMA und PMA und Ionomycin.

Wie in der Literatur schon für andere Promotor-3'UTR-Konstrukte beschrieben, ist die Insertion der 3'UTR mit einer Verringerung der Genexpression gegenüber den Reporterplasmiden verbunden (Kruys et al., 1992; Longley et al., 1999; Seiler-Tuyns et al., 1999; Tebo et al., 2000). Ferner wurde eine Abhängigkeit des Einflusses der 3'UTR von verschiedenen Einflussfaktoren beschrieben. Konform dazu sind die Ergebnisse dieser Arbeit:

In Monozyten nimmt der hemmende Einfluss der 3'UTR bei Stimulation zu. Bei Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgt eine Stimulation des IL-10-Promotors via cAMP-respondierender Elemente, was zu einer Erhöhung der Genexpression führt (Brenner et al., 2003). Unter diesen Bedingungen nimmt auch der Einfluss der 3'UTR in pGL3-proIL10-UTR zu. So wird die Genexpression von IL-10 also durch cAMP nicht nur

durch Sequenzen der Promotor/ *enhancer* Region getriggert, sondern vermutlich gleichzeitig die Stabilität der mRNA herabgesetzt. Damit werden die Ergebnisse der Versuche mit dem SV40-Promotor dahingehend bestätigt, dass nicht nur der Promoter, sondern auch die 3'UTR auf einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration reagiert und ihr Einfluss auf die Genexpression damit variiert. Dadurch wird auch die Frage in den Raum gestellt, ob es nicht nur im Promotor, sondern auch in der 3'UTR des IL-10 Gens cAMP respondierende Elemente gibt. Im Unterschied zu den Ergebnissen mit dem SV40-Promotor ist die Funktion der 3'UTR im Plasmid mit dem IL-10 Promotor scheinbar vom Vorhandensein von Stimulatoren abhängig, da ohne Zugabe von cAMP die Genexpression im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst wird.

Eine Kopplung des Einflusses der Genexpression bei Insertion der 3'UTR mit der Aktivität bestimmter Faktoren ist auch von der KC von Mäusen bekannt. In Endothelzellen von Mäusen wird eine an die 3'UTR geknüpfte Destabilisierung der mRNA durch Zugabe von TNF- α und in Zellen des proximalen Nierentubulus durch IL-1 verringert (Tebo et al., 2000). Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die Funktion der 3'UTR des IL-10 Gens noch von weiteren Faktoren als der intrazellulären cAMP-Konzentration abhängig ist. Im Anschluss daran wurde gezeigt, dass die Wirkung von IL-1 an verschiedenen mRNAs durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird. Eine Stabilisierung der mRNA von IL-8 und GM-CSF (*granulocyte and macrophage colony stimulating factor*) erfolgt offensichtlich via p38 MAPK, während der Einfluss von IL-1 auf die mRNA des Chemokins Gro3 davon unabhängig ist (Tebo et al., 2003). Dies unterstreicht die Abhängigkeit der Funktionen von 3'UTRs von den untersuchten Zelltypen und damit dem Vorhandensein potentieller Einflussfaktoren.

Eine durch eine Stimulation der Genexpression hervorgerufene Beeinflussung des Effektes der 3'UTR auf die vom IL-10 Promotor getriebene Genexpression ist in HL-60 und Jurkat nicht zu verzeichnen. In beiden Zelllinien, sowohl in myelo-monozytären Zellen, als auch in T-Zellen, wird die Genexpression durch die 3'UTR um etwa 50% gehemmt. Bei Stimulation wird dieser Effekt nicht größer, so dass davon ausgegangen werden kann, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Monozyten und Beobachtungen an der IL-10 3'UTR von Mäusen, die humane 3'UTR nicht auf PMA oder Ionomycin anspricht (Powell et al., 2000). Dies kann auf den Charakteristika, und damit den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen der verwendeten Zellen, aber auch auf der direkten Ansprechbarkeit der 3'UTR auf verschiedene Substanzen beruhen.

6.3 Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression in Abhängigkeit von der Orientierung

In weiteren Untersuchungen wurde die Luciferaseexpression in Plasmiden mit entgegen der Kodierungsrichtung eingesetzten 3'UTR gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass kein signifikanter Unterschied in der Hemmung der Genexpression durch die *antisense* 3'UTR gegenüber der 3'UTR in Kodierungsrichtung besteht.

In allen drei verwendeten Zelllinien, welche zur myelomonozytären Reihe des Immunsystems bzw. zu den T-Lymphozyten zählen, wurden die gleichen Beobachtungen gemacht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Eigenschaft des IL-10 Gens handelt, welche innerhalb des Immunsystems relativ unabhängig vom Zelltyp ist.

Dies scheint ein wichtiger Aspekt zu sein, da die Klonierung der 3'UTR von NOS II (*nitric oxide synthase II*) in Kodierungsrichtung eine Destabilisierung der mRNA zur Folge hatte, die entgegen der Kodierungsrichtung eingestzte 3'UTR keinen Effekt hatte. Die gemessene Genexpression bezog sich hier nicht auf Zellen des Immunsystems, sondern auf Zellen eines Adenokarzinoms des Kolon (Rodriguez-Pascual et al., 2000).

Die Ergebnisse von Versuchen mit der 3'UTR von TNF- α in monozytären Zellen sind mit den hier gemachten vergleichbar. Sowohl bei Klonierung der 3'UTR in ein Konstrukt mit dem Nativpromotor als auch mit einem Fremdpromotor kam es unabhängig von der Orientierung zu einer Reduktion der mRNA-Konzentration von TNF- α (Seiler-Tuyns et al., 1999).

6.4 Hintergründe und Mechanismen des Einflusses der 3'UTR auf die Genexpression

Sowohl eine durch den SV40 Promotor, als auch eine durch den nativen Promotor getriebene IL-10 Produktion wird durch die 3'UTR gehemmt. Es stellt sich nun die Frage, ob der Mechanismus, der diesem hemmenden Einfluss auf die Genexpression zugrunde liegt, auf die Ebene der mRNA beschränkt ist, oder ob auch auf Ebene der Transkription eine Regulation stattfindet. Es scheint klar zu sein, dass die 3'UTR posttranskriptional durch destabilisierende Elemente wie AREs die Abbaurate der mRNA beschleunigen kann (Brewer et al., 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise, dass eine Regulation der Genexpression durch die 3'UTR von IL-10 auch auf transkriptioneller Ebene stattfindet: Bei der Verwendung des einen wie des anderen Promotors und der 3'UTR entsteht die gleiche

mRNA. Der hemmende Einfluss auf die Genexpression ist in den Plasmidkonstrukten mit dem IL-10 Promotor prozentual allerdings geringer als mit dem SV40 Promotor. Demzufolge scheint die 3'UTR nicht nur die Stabilität der mRNA herabzusetzen, da sonst die Genexpression mit der 3'UTR in beiden Promotorkonstrukten gleich sein müsste. Zu vermuten ist hier die Existenz eines weiteren vom Promotor abhängigen Mechanismus, welcher in die Transkription eingreift. Dementsprechend könnten verschiedene Promotoren auf unterschiedliche Art und Weise in der Lage sein, mit der 3'UTR am Ende des Gens zu interagieren und die Translation und die Entstehung einer mRNA zu beeinflussen.

Dies entspricht auch den Beobachtungen, die mit der 3'UTR von TNF- α gemacht wurden (Seiler-Tuyns et al., 1999). Die Genexpression in Konstrukten mit dem nativen Promotor und der 3'UTR unterschied sich von der in Konstrukten mit dem CMV Promotor. Dadurch kam diese Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass die Expression von TNF- α durch die 3'UTR sowohl posttranskriptional als auch auf Ebene der Transkription reguliert wird.

Interessant sind gleichzeitig die molekularen Mechanismen, durch welche der Einfluss der 3'UTR auf die Genexpression moduliert wird.

Als ein möglicher Signaltransduktionsweg für die Stabilität der TNF- α mRNA, sowie auch anderer Gene, wird die p38 MAPK beschrieben. Die Beeinflussung der Genexpression durch diesen Mechanismus ist an das Vorhandensein der 3'UTR gebunden. So ist die Stabilität der TNF- α mRNA bei Mäusen an die Interaktion von TNF- α 3'UTR, und der Produkte des Signalübertragungsweges der p38 MAPK gekoppelt (Neininger et al., 2002). Mäuse, bei denen das Gen der Kinase inaktiviert worden war, zeigten eine geringere Stabilität der TNF- α mRNA, als solche mit intaktem Gen. Ähnliche Beobachtungen wurden mit den mRNAs der Zytokine IL-1 α , IL-1 β und IL-8 gemacht. Bei Hemmung des p38 MAPK *pathways* war die Halbwertszeit der AREs enthaltenden mRNAs herabgesetzt (Frevel et al., 2003).

Desweiteren gelang an der 3'UTR von IL-8 und GM-CSF die Identifikation von für den Effekt des p38 MAPK *pathway* verantwortlichen Sequenzen, sowie zweier Bindungsstellen für das Protein HuR an der 3'UTR der mRNA von *c-fos*. Der Effekt von p38 MAPK an der 3'UTR von IL-8 wird hauptsächlich durch das erste AUUUA Motiv und nicht, wie eventuell anzunehmen, von den zwei überlappenden AUUUA Motiven am 3'Ende der identifizierten Sequenzen vermittelt (Winzen et al., 2004). Da Mutanten ohne AUUUA auf eine Stimulation von p38 nicht mit einer erhöhten mRNA-Stabilität reagierten, wurde geschlussfolgert, dass die Wirkung von p38 an das Vorhandensein des

Pentamers AUUUA und nicht so sehr an das Überlappen dieser Sequenzen gekoppelt ist. Daneben wurde eine 30 Nukleotide umfassende *auxiliary domain* identifiziert, die ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der mRNA-Stabilität durch p38 spielt, allerdings keine AUUUA-Pentamere aufweist.

Eine Beeinflussung der AREs und AUUUAs enthaltenden mRNA von IL-10 durch p38 MAPK wurde noch nicht beschrieben, ist aber insbesondere vor dem Hintergrund der vorhandenen Sequenzhomologien und der schon bekannten ähnlichen Einflüsse auf die Genexpression besonders von TNF- α noch zu untersuchen.

Relativ sicher ist dagegen die Beeinflussung des IL-10 Gens durch das an die RNA bindende Protein AUF1. Dieses Protein bindet spezifisch an das Pentamer AUUUA, wobei mit steigender aufeinanderfolgender Kopienzahl die Affinität des Proteins zur mRNA zunimmt. Diese Zunahme geht dann mit einer erhöhten Destabilisierung der mRNA einher und ist mit entscheidend für die Expression von IL-10 (DeMaria and Brewer, 1996; Brewer et al., 2003).

Für die an der Regulation der Genexpression beteiligten Mechanismen kommen also verschiedene Faktoren in Frage. Ein Aspekt ist dabei die Interaktion von Proteinen wie AUF1 und die Produkte des p38 MAPK *pathway* mit der 3'UTR und damit deren Beeinflussung der Stabilität der mRNA. Andererseits ist die Interaktion zwischen 3'UTR und dem Promotor und dem Gesichtspunkt der Regulation der Transkription des IL-10 Gens weiter zu beleuchten und bisher gemachte Beobachtungen mit dem IL-10 Promotor zu diskutieren.

6.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Schließlich bleibt die Frage nach der klinischen Relevanz der Regulation der IL-10 Expression und deren Nutzen für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

Von besonderem Interesse ist dabei die Ausschüttung von IL-10 durch T-Zellen, welche hier in der Zelllinie Jurkat untersucht wurde. IL-10 ist maßgeblich an der Differenzierung der T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen beteiligt, welche dann die für ihre Subpopulation charakteristischen Zytokine ausschütten. Unter dem Einfluss von IL-10 werden vermehrt Th2-Zellen gebildet, welche u. a. IL-10, IL-4, IL-13 und IL-5 sezernieren. Als Folge dessen werden B-Lymphozyten aktiviert und zur Bildung spezifischer Antikörper angeregt. Pathophysiologische Relevanz hat dieses Verhältniss von Th1- zu Th2-Zellen beim Entstehen von Autoimmunkrankheiten, sowie Allergien und atopischen Erkrankungen.

Diese weisen eine Korrelation mit erhöhter oder erniedrigter IL-10 Produktion auf. Eine erniedrigte IL-10 Produktion von Makrophagen, die im Sputum von Asthmatikern

gefunden wurden (Chung, 2001), ist wahrscheinlich im Zusammenhang mit in der 3'UTR identifizierten Polymorphismen zu sehen. Ein solcher Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism, SNP*) befindet sich an Position 4299 des IL-10 Gens. Er kommt in zwei Allelen vor und weist einen Unterschied in der Verteilung zwischen Gesunden und an Asthma erkrankten Probanden auf (Lyon et al., 2004). Von 518 Kindern (319 Jungen und 199 Mädchen), die nach der CAMP-Studie (1999) an leichtem bis mittelschwerem Asthma leiden, trugen 75% ein C-Allel: 50% waren heterozygot T/ C und 25% homozygot C/ C. Im Gegensatz zu homozygoten T/ T Individuen war die Lungenfunktion in Individuen mit dem C-Allel signifikant schlechter, und bei homozygoten C/ C schlechter als bei heterozygoten T/ C. Dies ist Anhaltspunkt dafür, dass dieses Nukleotid der 3'UTR des IL-10 Gens einen Einfluss auf die IL-10 Expression und damit auf die Ausprägung dieses komplexen Krankheitsbildes haben kann.

Andere Untersuchungen stützen diese Ergebnisse. Patienten mit atopischem Asthma sezernieren als Antwort auf ein potentiell allergisches Agens weniger IL-10 als nicht-Atopiker, wodurch es zu einer für das Asthma typischen Entzündungsreaktion der Bronchialschleimhaut mit den entsprechenden Symptomen kommen kann (Bottcher et al., 2003). Interessanterweise besteht in den Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis ebenfalls ein relativer IL-10 Mangel (Asadullah et al., 1998).

Im Gegensatz dazu liegt in der Haut von Patienten mit allergischer Dermatitis ein Überschuss an IL-10 vor (Gutgesell et al., 1994; Ohmen et al., 1995). Damit geht eine im Mausmodell nachgewiesene Th2-spezifische Immunantwort einher, die durch eine Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten mit darauffolgender Sezernierung von Antikörpern einhergeht (Laouini et al., 2003).

Zusammenfassend liegt bei atopischen Erkrankungen also eine Dysregulation der IL-10 Synthese vor. Eine verminderte IL-10 Ausschüttung führt zu einer ungebremsten Entzündungsreaktion, erhöhte IL-10 Spiegel sind von einer Überregulation der Th2 Antwort des Immunsystems und entsprechender Antikörperbildung begleitet. Geht man davon aus, dass sowohl die atopische Dermatitis als auch das Asthma ähnliche pathogenetische Hintergründe haben, so ist auch anzunehmen, dass beiden ursächlich eine Über- oder Unterregulation der IL-10 Produktion zugrunde liegt. Dementsprechend ist es ebenfalls möglich, dass die in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis gefundenen erhöhten IL-10 Spiegel als Reaktion auf einen ursprünglichen IL-10 Mangel zu sehen sind, welcher Ursache für eine überschüssige Entzündung ist.

Auch Melanomzellen und Zellen, die aus deren Metastasen isoliert wurden, weisen eine erhöhte IL-10 Produktion auf (Kruger-Krasagakes et al., 1994). Als Einflussfaktor wird das Protein AUF1 vermutet, welches mit hoher Affinität an die AREs der 3'UTR verschiedener Gene und auch an die des IL-10 Gens bindet (DeMaria and Brewer, 1996). Bindet AUF1 an die 3'UTR eines Gens, so wird dadurch der Abbau der mRNA beschleunigt.

Interessanterweise konnte dieser Faktor im Gegensatz zu normalen Melanozyten in Melanomzellen nicht nachgewiesen werden, was mit einer verlängerten Halbwertszeit der mRNA und erhöhter Produktion von IL-10 einherging. Daraus ist zu schlussfolgern, dass die 3'UTR und der daran bindende Faktor AUF1 für einen raschen Abbau der mRNA in normalen Zellen sorgen, und ein Fehlen des einen oder des anderen mit einer durch die Überproduktion von IL-10 hervorgerufenen Immunsuppression verbunden sein kann (Brewer et al., 2003). Diese Immunsuppression bewahrt den Tumor vor einer gegen ihn gerichteten Immunantwort und ermöglicht so ein schnelleres Wachstum und die Ausbreitung von Metastasen.

Trotz der schon vielseitig bekannten Beteiligung von IL-10 an verschiedenen Krankheiten gibt es nur sehr wenige Versuche einer entsprechenden Therapie.

So sind bisher an Patienten mit Psoriasis und an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entsprechende Therapieversuche durchgeführt worden (Asadullah et al., 1998; Li and He, 2004). Die Therapie der Psoriasis mit subkutan appliziertem IL-10 war erfolgreich, wohingegen trotz eines nachgewiesenen IL-10 Mangels in der erkrankten Darmmukosa, eine Therapie des Morbus Crohn unbefriedigend blieb (Asadullah et al., 2003).

Neuere Untersuchungen geben jedoch Anlass zur Hoffnung, dass es letztendlich eine IL-10 Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen geben wird. Es gilt hierbei, das Problem systemischer Nebenwirkungen zu umgehen, und eine möglichst hohe IL-10 Konzentration am Krankheitsherd, also dem Darm, zu erreichen. Dabei hat sich die Entwicklung eines IL-10 sezernierenden, magensäureresistenten Bakterienstamm *Lactococcus lactis* bewährt. Bei oraler Applikation milderte er bei Mäusen eine durch Dextrane induzierte Darmentzündung und verhinderte die spontane Entwicklung einer IDB in IL-10 knock-out Mäusen. An Schweinen wurde ebenfalls eine Symptomminderung durch von *L. lactis* offensichtlich lokal sezerniertem IL-10 beobachtet. Ähnlich wirken auch regulatorische T-Zellen, die mit einem retroviralen Vektor zusammengebracht und so

zu IL-10 sezernierenden Zellen transformiert wurden (Li and He, 2004). Bei systemischer Applikation werden sie durch einen Entzündungsreiz aktiviert und sezernieren IL-10.

All diese Verfahren sind bislang nicht am Menschen getestet worden, haben aber das Potential, gerade bei bisher therapierefraktären Erkrankungen, ein Schritt in Richtung der Verbesserung des Krankheitsbildes und damit der Lebensqualität des Patienten zu sein.

7. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit liefert grundlegende Erkenntnisse über die Funktion der 3'UTR des humanen IL-10 Gens bei der Beeinflussung der Genexpression. Dabei konnten die am Beginn gestellten Fragen beantwortet, und Rückschlüsse auf eventuelle Ergebnisse weitergehender Untersuchungen gezogen werden.

Dennoch werden neue Aspekte aufgeworfen, die diese Arbeit zum Ausgangspunkt zukünftiger Untersuchungen werden lassen. Deren Ziel ist das Aufdecken molekulare Mechanismen, durch welche die 3'UTR Einfluss auf die Genexpression nimmt. Grundlage ist dabei die Beobachtung, dass der hemmende Effekt der 3'UTR zwischen den Zelltypen des Immunsystems variiert und insbesondere in Monozyten von einer Stimulation der Genexpression abhängig ist. Offen ist auch, ob es noch weitere DNA-Sequenzen gibt, die die Expression von IL-10 beeinflussen. Desweiteren wurden nur Beobachtungen mit Zellen des Immunsystems durchgeführt. Bekannt ist, dass diese Zellen in unterschiedlicher Quantität und unter verschiedenen Vorraussetzungen IL-10 sezernieren. Unter diesem Aspekt wäre es denkbar, dass unter bestimmten Bedingungen auch andere Zellen in der Lage sind, IL-10 zu sezernieren.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollte bei der Untersuchung der IL-10 Expression allerdings sowohl die 3'UTR selbst, wie auch ihre Interaktion mit dem Promotor mit einbezogen werden. Ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen den Eigenschaften unterschiedlicher Zelltypen und Zellen unterschiedlicher Differenzierung und der Beeinflussung der Genexpression durch verschiedene Genabschnitte ist in nachfolgenden Arbeiten zu beachten.

Die Beteiligung von Sequenzen wie der 3'UTR des IL-10 Gens an der Regulation der Genexpression zeigt, die Vielfältigkeit und Komplexität derartiger Mechanismen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass hier nur ein kleiner Ausschnitt der IL-10 Genregulation näher untersucht wurde. In dieser Untersuchung wurde nicht auf andere Zellen oder gar Zellverbände, sowie eine genaue Differenzierung zwischen transkriptioneller und posttranskriptioneller Regulation eingegangen.

Um pathophysiologische Mechanismen besser zu verstehen, die mit einer Dysregulation der IL-10 Expression einhergehen, ist es daher notwendig, die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext anderer und zukünftiger Arbeiten zu sehen. So kann es gelingen, für die Genregulation relevante Faktoren zu identifizieren, und neue Therapieansätze zu entwickeln.

8. Literaturverzeichnis

- (1999). "The Childhood Asthma Management Program (CAMP): design, rationale, and methods. Childhood Asthma Management Program Research Group." Control Clin Trials **20**(1): 91-120.
- Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2005). Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Alberts, B., J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). Molecular Biology of the cell, Garland Science Taylor and Francis Group, New York.
- Aries, P., R. K Kurowski and H. Renz-Polster (2001). Basislehrbuch Innere Medizin. München, Jena.
- Arima, H., M. Takahashi, Y. Aramaki, T. Sakamoto and S. Tsuchiya (1998). "Specific inhibition of interleukin-10 production in murine macrophage-like cells by phosphorothioate antisense oligonucleotides." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **8**(4): 319-27.
- Asadullah, K., W. Sterry, K. Stephanek, D. Jasulaitis, M. Leupold, H. Audring, H. D. Volk and W. D. Docke (1998). "IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach." J Clin Invest **101**(4): 783-94.
- Asadullah, K., W. Sterry and H. D. Volk (2003). "Interleukin-10 Therapy - Review of a New Approach." Pharmacol Rev **55**(2): 541-569.
- Baehr, R., H. Volk, R. Reinke, P. Falck and H. Wolff (1989). "An immune monitoring program for controlling immunosuppressive therapy." Transplant Proc **21**(1 Pt 1): 1189-1191.
- Bakheet, T., M. Frevel, B. R. Williams, W. Greer and K. S. Khabar (2001). "ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins." Nucleic Acids Res **29**(1): 246-54.
- Balkwill, F. (2000). The Cytokine Network. London, Oxford University Press.
- Benkhart, E. M., M. Siedlar, A. Wedel, T. Werner and H. W. Ziegler-Heitbrock (2000). "Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression." J Immunol **165**(3): 1612-7.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.

- Bottcher, M. F., J. Bjurström, X. M. Mai, L. Nilsson and M. C. Jenmalm (2003).
 "Allergen-induced cytokine secretion in atopic and non-atopic asthmatic children."
Pediatr Allergy Immunol **14**(5): 345-50.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brenner, S., S. Prosch, K. Schenke-Layland, U. Riese, U. Gausmann and C. Platzer (2003).
 "cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation." J Biol Chem **278**(8): 5597-604.
- Brewer, G., S. Saccani, S. Sarkar, A. Lewis and S. Pestka (2003). "Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1." J Interferon Cytokine Res **23**(10): 553-64.
- Brightbill, H. D., S. E. Plevy, R. L. Modlin and S. T. Smale (2000). "A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages." J Immunol **164**(4): 1940-51.
- Chen, C. Y. and A. B. Shyu (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." Trends Biochem Sci **20**(11): 465-70.
- Chung, F. (2001). "Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma." Mediators Inflamm **10**(2): 51-9.
- Cok, S. J., S. J. Acton and A. R. Morrison (2003). "The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U." J Biol Chem **278**(38): 36157-62.
- de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." J Exp Med **174**(4): 915-24.
- Dean, J. L., R. Wait, K. R. Mahtani, G. Sully, A. R. Clark and J. Saklatvala (2001). "The 3'-untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR." Mol Cell Biol **21**(3): 721-30.
- D'Elia, M. M., R. Josien, M. Manghetti, A. Amedei, M. de Carli, M. C. Cuturi, G. Blanche, F. Buzelin, G. del Prete and J. P. Soulillou (1997). "Predominant Th1 cell

- infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts." Kidney Int **51**(6): 1876-84.
- DeMaria, C. T. and G. Brewer (1996). "AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation." J Biol Chem **271**(21): 12179-84.
- Di Marco, S., Z. Hel, C. Lachance, H. Furneaux and D. Radzioch (2001). "Polymorphism in the 3'-untranslated region of TNFalpha mRNA impairs binding of the post-transcriptional regulatory protein HuR to TNFalpha mRNA." Nucleic Acids Res **29**(4): 863-71.
- Fan, X. C. and J. A. Steitz (1998). "Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs." Embo J **17**(12): 3448-60.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond and T. R. Mosmann (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J Exp Med **170**(6): 2081-95.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard and A. O'Garra (1991a). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." J Immunol **147**(11): 3815-22.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore and A. O'Garra (1991b). "IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells." J Immunol **146**(10): 3444-51.
- Fluckiger, A. C., P. Garrone, I. Durand, J. P. Galizzi and J. Banchereau (1993). "Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes." J Exp Med **178**(5): 1473-81.
- Frevel, M. A., T. Bakheet, A. M. Silva, J. G. Hissong, K. S. Khabar and B. R. Williams (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts." Mol Cell Biol **23**(2): 425-36.
- Gesser, B., H. Leffers, T. Jinqun, C. Vestergaard, N. Kirstein, S. Sindet-Pedersen, S. L. Jensen, K. Thestrup-Pedersen and C. G. Larsen (1997). "Identification of functional domains on human interleukin 10." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14620-5.
- Go, N. F., B. E. Castle, R. Barrett, R. Kastelein, W. Dang, T. R. Mosmann, K. W. Moore and M. Howard (1990). "Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells." J Exp Med **172**(6): 1625-31.

- Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1996). "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells." J Exp Med **184**(1): 19-29.
- Gutgesell, C., H. Yssel, D. Scheel, J. Gerdes and C. Neumann (1994). "IL-10 secretion of allergen-specific skin-derived T cells correlates positively with that of the Th2 cytokines IL-4 and IL-5." Exp Dermatol **3**(6): 304-13.
- Hentze, M. W. and L. C. Kuhn (1996). "Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8175-82.
- Itoh, K. and S. Hirohata (1995). "The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation." J Immunol **154**(9): 4341-50.
- Janeway, C. A. (2002). Immunologie, Spektrum-Verlag Heidelberg; Berlin.
- Jarrousse, A. S., F. Petit, C. Kreutzer-Schmid, R. Gaedigk and H. P. Schmid (1999). "Possible involvement of proteasomes (prosome) in AUUUA-mediated mRNA decay." J Biol Chem **274**(9): 5925-30.
- Kim, J. M., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, T. A. Khan and K. W. Moore (1992). "Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes." J Immunol **148**(11): 3618-23.
- Kishore, R., J. M. Tebo, M. Kolosov and T. A. Hamilton (1999). "Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages." J Immunol **162**(5): 2457-61.
- Kox, W., T. Volk, S. Kox and H. Volk (2000). "Immunomodulatory therapies in sepsis." Intensive Care Med **26**(Suppl 1): 124-8.
- Kruger-Krasagakes, S., K. Krasagakis, C. Garbe, E. Schmitt, C. Huls, T. Blankenstein and T. Diamantstein (1994). "Expression of interleukin 10 in human melanoma." Br J Cancer **70**(6): 1182-5.
- Kruys, V., K. Kemmer, A. Shakhov, V. Jongeneel and B. Beutler (1992). "Constitutive activity of the tumor necrosis factor promoter is canceled by the 3' untranslated region in nonmacrophage cell lines; a trans-dominant factor overcomes this suppressive effect." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 673-7.
- Kucharzik, T., R. Stoll, N. Lugering and W. Domschke (1995). "Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD)." Clin Exp Immunol **100**(3): 452-6.

- Laouini, D., H. Alenius, P. Bryce, H. Oettgen, E. Tsitsikov and R. S. Geha (2003). "IL-10 is critical for Th2 responses in a murine model of allergic dermatitis." J Clin Invest **112**(7): 1058-66.
- Leventhal, P. S. and P. J. Bertics (1993). "Activation of protein kinase C by selective binding of arginine-rich polypeptides." J Biol Chem **268**(19): 13906-13.
- Li, M. C. and S. H. He (2004). "IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **10**(5): 620-5.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipurski, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell (2001). Molekulare Zellbiologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Longley, D. B., D. M. Steel and A. S. Whitehead (1999). "Posttranscriptional regulation of acute phase serum amyloid A2 expression by the 5'- and 3'-untranslated regions of its mRNA." J Immunol **163**(8): 4537-45.
- Lyon, H., C. Lange, S. Lake, E. K. Silverman, A. G. Randolph, D. Kwiatkowski, B. A. Raby, R. Lazarus, K. M. Weiland, N. Laird and S. T. Weiss (2004). "IL10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children." Genet Epidemiol **26**(2): 155-65.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Mori, N. and D. Prager (1997). "Activation of the interleukin-10 gene in the human T lymphoma line HuT 78: identification and characterization of NF-kappa B binding sites in the regulatory region of the interleukin-10 gene." Eur J Haematol **59**(3): 162-70.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Neininger, A., D. Kontoyiannis, A. Kotlyarov, R. Winzen, R. Eckert, H. D. Volk, H. Holtmann, G. Kollias and M. Gaestel (2002). "MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels." J Biol Chem **277**(5): 3065-8.
- Ohmen, J. D., J. M. Hanifin, B. J. Nickoloff, T. H. Rea, R. Wyzykowski, J. Kim, D. Jullien, T. McHugh, A. S. Nassif and S. C. Chan (1995). "Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions." J Immunol **154**(4): 1956-63.

- Piecyk, M., S. Wax, A. R. Beck, N. Kedersha, M. Gupta, B. Maritim, S. Chen, C. Gueydan, V. Kruys, M. Streuli and P. Anderson (2000). "TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha." Embo J **19**(15): 4154-63.
- Platzer, C. (2003). "Interleukin 10: An anti-inflammatory and immunosuppressive cytokine in normal and pathological immune response." Curr Med Chem **2**(4): 309-323.
- Platzer, C., E. Fritsch, T. Elsner, M. H. Lehmann, H. D. Volk and S. Prosch (1999). "Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells." Eur J Immunol **29**(10): 3098-104.
- Platzer, C., C. Meisel, K. Vogt, M. Platzer and H. D. Volk (1995). "Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs." Int Immunol **7**(4): 517-23.
- Powell, M. J., S. A. Thompson, Y. Tone, H. Waldmann and M. Tone (2000). "Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region." J Immunol **165**(1): 292-6.
- Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, L. B. Caddle and R. L. Coffman (1993). "Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice." Int Immunol **5**(11): 1461-71.
- Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, S. Menon, L. B. Caddle and R. L. Coffman (1994). "Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells." Immunity **1**(7): 553-62.
- Riese, U., S. Brenner, W. D. Docke, S. Prosch, P. Reinke, M. Oppert, H. D. Volk and C. Platzer (2000). "Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells." Mol Cell Biochem **212**(1-2): 45-50.
- Rodriguez-Pascual, F., M. Hausding, I. Ihrig-Biedert, H. Furneaux, A. P. Levy, U. Forstermann and H. Kleinert (2000). "Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR." J Biol Chem **275**(34): 26040-9.
- Schlaak, J. F., M. Buslau, W. Jochum, E. Hermann, M. Girndt, H. Gallati, K. H. Meyer zum Buschenfelde and B. Fleischer (1994). "T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset." J Invest Dermatol **102**(2): 145-9.

- Schreiber, S., T. Heinig, H. G. Thiele and A. Raedler (1995). "Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease." Gastroenterology **108**(5): 1434-44.
- Seiler-Tuyns, A., N. Dufour and F. Spertini (1999). "Human tumor necrosis factor-alpha gene 3' untranslated region confers inducible toxin responsiveness to homologous promoter in monocytic THP-1 cells." J Biol Chem **274**(31): 21714-8.
- Shaw, G. and R. Kamen (1986). "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation." Cell **46**(5): 659-67.
- Stelmach, I., J. Jerzynska and P. Kuna (2002). "A randomized, double-blind trial of the effect of glucocorticoid, antileukotriene and beta-agonist treatment on IL-10 serum levels in children with asthma." Clin Exp Allergy **32**(2): 264-9.
- Tebo, J., S. Der, M. Frevel, K. S. Khabar, B. R. Williams and T. A. Hamilton (2003). "Heterogeneity in control of mRNA stability by AU-rich elements." J Biol Chem **278**(14): 12085-93.
- Tebo, J. M., S. Datta, R. Kishore, M. Kolosov, J. A. Major, Y. Ohmori and T. A. Hamilton (2000). "Interleukin-1-mediated stabilization of mouse KC mRNA depends on sequences in both 5'- and 3'-untranslated regions." J Biol Chem **275**(17): 12987-93.
- Tone, M., M. J. Powell, Y. Tone, S. A. Thompson and H. Waldmann (2000). "IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3." J Immunol **165**(1): 286-91.
- van der Poll, T., J. Jansen, M. Levi, H. ten Cate, J. W. ten Cate and S. J. van Deventer (1994). "Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees." J Exp Med **180**(5): 1985-8.
- van Deventer, S. J., C. O. Elson and R. N. Fedorak (1997). "Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group." Gastroenterology **113**(2): 383-9.
- Winzen, R., G. Gowrishankar, F. Bollig, N. Redich, K. Resch and H. Holtmann (2004). "Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR." Mol Cell Biol **24**(11): 4835-47.
- Wissing, K. M., E. Morelon, C. Legendre, L. De Pauw, A. LeBeaut, P. Grint, M. Maniscalki, B. Ickx, P. Vereerstraeten, L. Chatenoud, H. Kreis, M. Goldman and D. Abramowicz (1997). "A pilot trial of recombinant human interleukin-10 in

kidney transplant recipients receiving OKT3 induction therapy." Transplantation **64**(7): 999-1006.

Zou, X. M., A. Yagihashi, K. Hirata, T. Tsuruma, T. Matsuno, K. Tarumi, K. Asanuma and N. Watanabe (1998). "Downregulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant and prolongation of rat liver allograft survival by interleukin-10." Surg Today **28**(2): 184-91.

Zuany-Amorim, C., S. Haile, D. Leduc, C. Dumarey, M. Huerre, B. B. Vargaftig and M. Pretolani (1995). "Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice." J Clin Invest **95**(6): 2644-51.

9. Anhang

9.1 Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Frau PD Dr. Cornelia Platzer vom Institut für Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung von Verbrauchsmaterialien, sowie die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Mein Dank gilt ihrer umfassenden Unterstützung bei der Planung der Experimente, der Diskussion der Ergebnisse, sowie Hilfestellung beim Anfertigen und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Karl-Jürgen Halbhuber für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine wissenschaftliche Unterstützung.

Darüber hinaus danke ich meinen ehemaligen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Frau Dr. med. Susanne Brenner, Frau Dr. rer. nat. Ulrike Riese und Frau M. Sc. Katja Schenke-Layland, sowie den MitarbeiterInnen des Institutes für Anatomie II der FSU Jena, die mich in moralischer und praktischer Hinsicht unterstützt haben.

Abschließend danke ich ganz besonders all den lieben Menschen, die durch ihr Interesse, nette Gesten und viele kleine alltägliche und nicht alltägliche Dinge zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts hat mich Frau PD Dr. Cornelia Platzer vom Institut für Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena unterstützt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Dissertation wurde von mir weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung, noch wurde die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Berlin, 18. April 2006

Anne Wendel

9.3 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Anne Wendel
Wohnort: Fennstrasse 17, 12439 Berlin
Geburtsdatum: 10. Dezember 1978
Geburtsort: Borna
Familienstand: ledig, ein Kind

Schulbildung:

1985-1991 Grundschule in Brandenburg a. d. Havel
1991-1998 Märkisches Gymnasium "Friedrich Grasow" in Brandenburg a. d. Havel
Abschluss: Abitur

Studium:

1998-1999 Studium der Biochemie an der Southern Oregon University
Ashland, Oregon/ USA
seit 10.1999 Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
seit 03.2001 Arbeit in der Forschungsgruppe IL-10 am Institut Anatomie II der FSU Jena
07.06.2006 3. Staatsexamen

Berlin, 18.April 2006

Anne Wendel